Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Standardisierung des Superpräzipitationstests an Herzmuskel-Aktomyosin und Untersuchungen an Ca^{++}-Antagonisten und β-Adrenoceptorliganden

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Inge Knyrim

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0142

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Standardisierung des Superpräzipitationstests an Herzmuskel-Aktomyosin und Untersuchungen an Ca^{++}-Antagonisten und ß-Adrenoceptorliganden

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Inge Knyrim

1981

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Moser
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Bojar

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Diese Arbeit wurde angeregt von den Herren Prof.Dr.R.Kaufmann und Prof.Dr.J.G.Moser. Prof.Dr.Moser hat die experimentellen Arbeiten und die Abfassung des Manuskripts betreut. Herrn Dr. R.Bayer, Dr.R.Rodenkirchen, Dr. R. Mannhold und Dr.A.J.Kaumann danke ich für Überlassung von Substanzen, Herrn Dr. R. Steiner für rege Diskussion der Ergebnisse und experimentelle Hilfe. Technisch wurden die experimentellen Arbeiten durch Frau B. Wagner wesentlich unterstützt.

Gewidmet all denen die mir - in welcher Form auch immer - während der Entstehungsgeschichte und bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Material und Methoden 7

Präparation von Aktomyosin 7

Versuchsablauf 11

Ergebnisse und Diskussion 13

1 Grundverlauf und Phasen der Superpräzipitation von Aktomyosin aus dem Schweineherzen 13

Orientierende Untersuchungen zur Kinetik der Aktomyosin-ATPase durch potentiometrische Titration 15

2 Ausarbeitung eines Präparationsverfahrens für Aktomyosin aus dem Schweineherzen 16

3 Einfluß der Temperatur und des Ionenmilieus auf die Superpräzipitation von Herz-Aktomyosin 24

4 Haben ß-Adrenergica und ß-Rezeptorenblocker einen direkten Einfluß auf die kontraktilen Proteine der Herzmuskelzelle ? 43

5 Einfluß von Ca^{++}-Antagonisten auf die Superpräzipitationskinetik 51

Abschließende Bemerkungen 56

Literaturverzeichnis 59

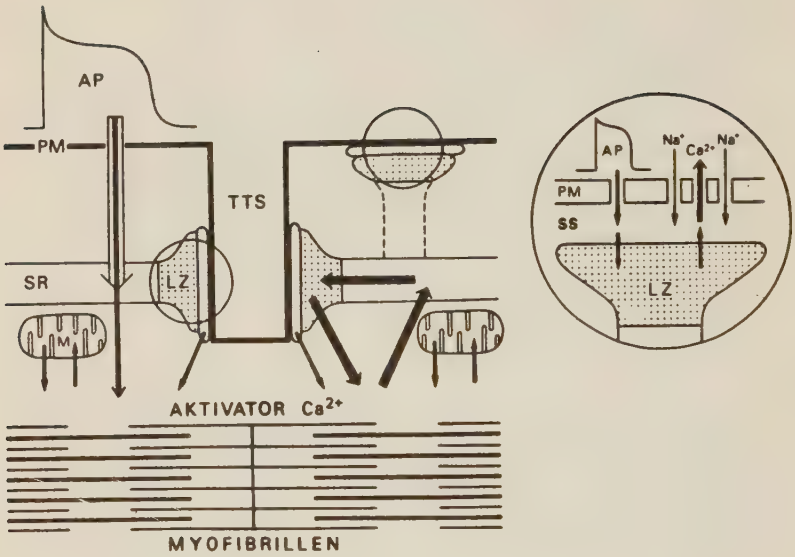
Einleitung

Alle Modelle der elektromechanischen Kopplung in der Herzmuskelzelle nehmen eine Reihe von Ionenflüssen für Na^+, K^+, Ca^{++} und Anionen (besonders Cl^-) an, die eine in Grenzen variable erregungsbedingte Ca^{++}-Ausschüttung in den myofibrillären Raum bewirken. Die Geschwindigkeit dieser Ausschüttung und die Verweildauer des Aktivator-Ca^{++} im myofibrillären Raum bestimmen dann den Aktivierungszustand des myofibrillären Systems. Dessen Kontraktionsfähigkeit ist somit Indikator der aktuellen Ca^{++}-Konzentration im myofibrillären Raum. Für den Konzentrationsbereich 10^{-8}-10^{-5}M geben etwa KAUFMANN et.al.(1) eine S-förmige Dosiseffekt-Kurve für die Simulation des Funktionszusammenhangs zwischen Kontraktionskraft und myofibrillärer Ca^{++}-Konzentration(Abb. 1).

Diese Annahme gilt in allen Modellen der elektromechanischen Kopplung insbesondere auch dann, wenn die peripheren Ionenflüsse pharmakologisch beeinflußt werden, woraus sich Änderungen in Größe, Zeitverlauf und Verweildauer der myofibrillären Ca^{++}-Konzentration und damit Änderungen im kontraktilen Verhalten der Herzmuskelzelle ergeben. Dies impliziert aber wiederum, daß die Angriffspunkte für Hormone, Neurotransmitter und Pharmaka ausschließlich peripher angenommen werden, das kontraktile System und seine Regulatorproteine aber durch derartige Substanzen zumindest kurzzeitig nicht unmittelbar beeinflußt werden.

Gegen diese Annahme sprechen Befunde etwa von HONIG u. REDDY(12) und HONIG(11), die zeigen konnten, daß Noradrenalin-Analoge und ß-Blocker sehr wohl die Aktomyosin-ATPase und das Verhalten von natürlichem Aktomyosin im Superpräzipitationstest beeinflussen können. Ihre Befunde wurden allerdings fraglich wegen Verwendung bereits pharmakologisch toxischer Konzentrationen der Agonisten. Immerhin lassen sich die Messungen dieser Autoren dahin deuten, daß der regulatorische Tropomyosin-Troponin-Komplex durch ß-Adrenoceptor-Liganden

Abbildung 1



Modell der elektromechanischen Kopplung nach KAUFMANN et al. (13)

Die kontraktionsaktivierende Ca^{++}-Konzentration im myofibrillären Raum wird durch transmembranäre Ca^{++}-Ströme und Rezirkulation des Ca^{++} über mitochondriale (M) und sarkoplasmatische (SR) Kompartimente cyclisch reguliert. Der Kontraktionszustand der Myofibrillen ist Indikator der aktuellen Ca^{++}-Konzentration.

AP	Aktionspotential	PM	Plasmamembran
LZ	Laterale Zisterne	SR	Sarkoplasmat. Retikulum
M	Mitochondrium	SS	Subsarkolemm

funktionell blockiert wird: das kontraktile System gerät unter den Versuchsbedingungen außer Kontrolle der myofibrillären Ca^{++}-Konzentration

Ebenso zeigte BLEEKER(1), daß der Ca^{++}-Antagonist Verapamil bei pharmakologisch durchaus relevanten Konzentrationen (10^{-7}M) stereospezifisch das Superpräzipitationsverhalten von Aktomyosin aus dem Meerschweinchenherzen beeinflußt

Auch langzeitige Einflüsse auf die Funktionsfähigkeit des kontraktilen Systems durch Neurotransmitter-Analoge sind nicht auszuschließen. So deuten SZÁBO et al.(27) die Änderungen des Superpräzipitationsverhaltens von Aktomyosin aus hypertrophiertem Myocard von isoprenalin-behandelten Kaninchen als direkten Einfluß auf die Regulatorfunktion einer der kleinen Myosin-Untereinheiten.

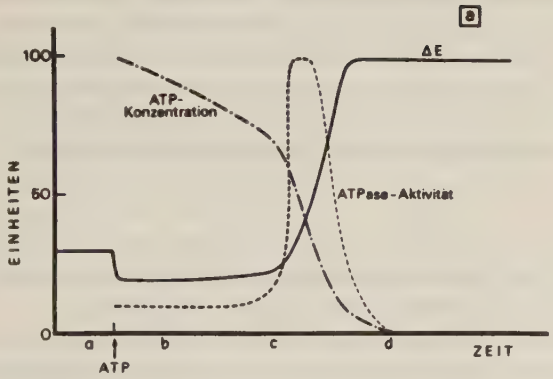
Alle diese Befunde setzen selbverständlich voraus, daß die betreffenden Pharmaka in unmittelbaren Kontakt mit der Myofibrillen-Struktur treten können. Solange direkte Beweise oder Gegenbeweise hierfür nicht erbracht worden sind, stellt sich die Frage, die dieser Arbeit zugrunde liegt:
Ist die Annahme richtig, daß ein pharmakologischer Einfluß auf die elektromechanische Kopplung ausschließlich peripher wirkt und das kontraktile System unbeeinflußt als Indikator der aktuellen myofibrillären Ca^{++}-Konzentration angenommen werden kann ?

Zur Prüfung des Funktionszustandes des kontraktilen Apparates unabhängig vom Einfluß der Membranfunktionen sind eine Reihe von Modellen vorgeschlagen worden: isolierte glyzerinbehandelte Muskelfasern (SZENT-GYÖRGYI(28) skinned fibers (NATORI(19), präzipitierte Aktomyosinfäden (SZENT-GYÖRGYI(28), die ebenfalls von SZENT-GYÖRGYI(28) entdeckte Superpräzipitation von Aktomyosingelen (EBASHI u.EBASHI(5), SERAYDARIAN et al.(23) sowie die allgemein geübte Praxis der Bestimmung der Aktomyosin-ATPase-Aktivität (GREEN u. MOMMAERTS(9), LECOCQ u. INESI(15), LIN u. MORALES(16)).Die Faser- und Fadenmodelle sind meßtechnisch schwierig zu handhaben, sodaß die meisten Autoren auf das Superpräzipitationsverfahren und die ATPase-Bestimmung zurückgreifen.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität mißt man häufig das in der Zeiteinheit freigesetzte Phosphat colorimetrisch (z.B. LECOCQ u. INESI (15)) oder radiochromatographisch (z.B. RÜEGG (24)). Beide Methoden sind außerordentlich störanfällig. Oder man mißt die bei der ATP-Hydrolyse eintretende pH-Änderung durch kontinuierliche Rücktitration (z.B. GREEN u. MOMMAERTS (9)). Nur die Radiochromatographie erreicht Nachweisempfindlichkeiten unter 10^{-9} Mol/ml, die in diesem System unbedingt erforderlich sind.

So bleibt die Messung der Superpräzipitationskinetik durch Trübungsmessung an suspendierten Aktomyosingelen immer noch die einfachste Methode für eine Charakterisierung des Funktionszustandes. Allerdings sind die einzelnen kinetischen Phasen der Trübungsentwicklung auch bei der Zuordnung zum elektronenmikroskopischen Befund immer noch schwer deutbar (Abb. 2 aus EBASHI u. NONOMURA (7)).

Abbildung 2



Ablauf der Superpräzipitation von Aktomyosingelen (Skelettmuskel) nach EBASHI u. NONOMURA(7).

Δ E Extinktionsänderung in relativen Einheiten

$T_{1/2}$ Halbwertszeit der Superpräzipitation

Sh. hierzu auch Abb.3 und Erklärungen im Text

Der Zeitverlauf der Superpräzipitation ist abhängig von der Funktionsfähigkeit der regulatorischen Proteine:

(1) der kleinen Untereinheiten des Myosins, welche die Wechselzahl der Aktomyosin-ATPase in Abhängigkeit von der Mg^{++}- und der Ca^{++}-Konzentration steuern (WEBER u. WINICUR (31)),

(2) des Tropomyosin-Troponin-Komplexes am Aktinfilament, der in Abhängigkeit von der Mg^{++}-Konzentration, vorallem aber der Ca^{++}-Konzentration die Aktin-Myosin-Interaktion und hierdurch mittelbar die ATPase-Aktivität steuert(PERRY(21).

Darüberhinaus dürften alpha-Aktinin (am Aktin) und die M-Linien-Proteine(am Myosin) an der Assoziatbildung beteiligt sein(Briskey et al.(3)(4)).

Es sind also eine ganze Reihe funktionell wichtiger Strukturproteine aus allen Funktionsbereichen der Sarkomerenstruktur am Prozess der Superpräzipitation beteiligt. Pharmakologische Einflüsse auf jedes dieser Proteine müsste quantifizierbare Änderungen des Verlaufs der Superpräzipitation bewirken.

Aus Voruntersuchungen unseres Labors (BODE u.MOSER(2); MOSER et al.(18); THEILE(29); FISCHER(8)) war bereits bekannt, daß sich der Superpräzipitationsverlauf von Herzmuskel-Aktomyosin durch eine Reihe von Verfahrens- und Versuchsparametern stark verändert. Für die Absicht dieser Arbeit war es zunächst notwendig,

(1) ein reproduzierbares Verfahren zur Darstellung von Aktomyosin aus dem Herzmuskel auszuarbeiten und

(2) Herzmuskel-Aktomyosin durch sein Verhalten gegenüber Änderungen von pH, Temperatur,Ionenstärke, Konzentration von ATP und den essentiellen Kationen K^{+},Mg^{++} und Ca^{++} ausreichend zu charakterisieren.

Hieraus ergibt sich

(3) eine begrenzte Anzahl von Versuchsbedingungen, unter denen der Einfluß von ß-Adrenoceptorliganden und Ca^{++}-Antagonisten in physiologisch-pharmakologisch relevanten Konzentrationen auf das Superpräzipitationsverhalten von Herzmuskel-Aktomyosin zu prüfen waren.

Material und Methoden

Alle verwendeten Lösungen wurden aus analysenreinen Chemikalien (Merck, Darmstadt und Serva, Heidelberg) in quarzdestilliertem Wasser angesetzt. Die geprüften Pharmaka stammten von folgenden Herstellern:

Verapamil.HCl : Isoptin^{R}-Injektionslösung Knoll AG (Ludwigshafen)

Nifedipine: Trockensubstanz Bayer AG(Wuppertal)

(-)-Isoproterenol: l-Alwdrinsulfat C.H.Boehringer (Ingelheim)

(+)- und (-)-Propranolol.HCl: ICI (Mecclesfield, Cheshire, Great Britain)

(-)-Bupranolol: Sanol(Monheim).

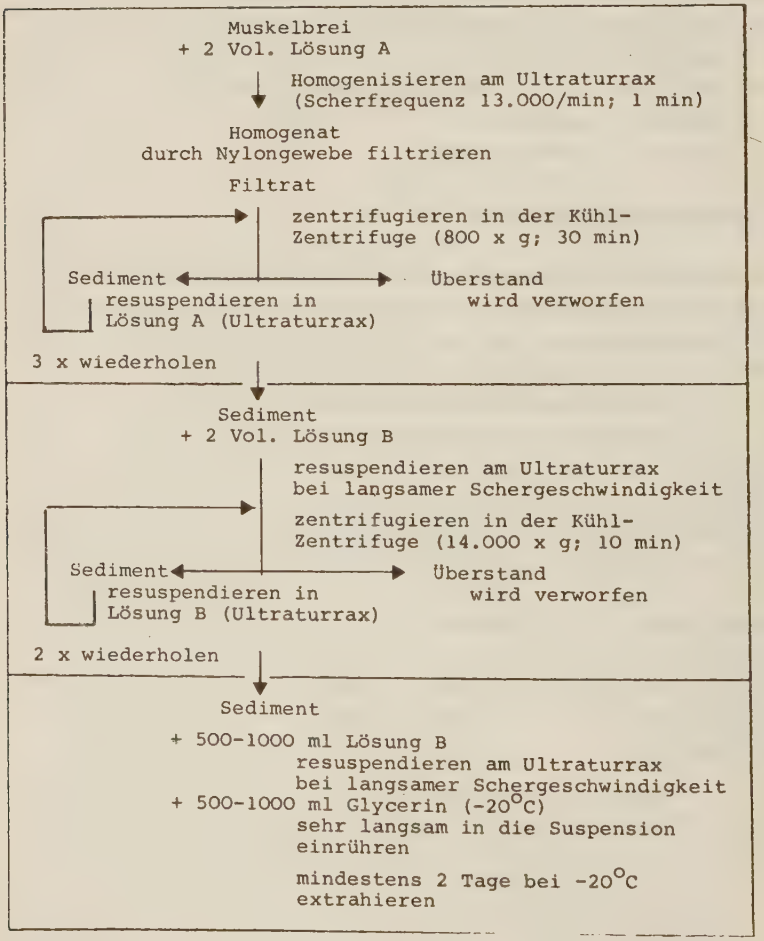
Präparation von Aktomyosin

Aus Kammermyocard wurden vorgereinigte Myofibrillen hergestellt, die durch Glycerinextraktion (Szent-Györgyi (6)) weitergereinigt und bei -20°C aufbewahrt werden konnten. Aus dem Myofibrillenpräparat wird Aktomyosin bei hoher Ionenstärke extrahiert (Bode u. Moser(20)). Für die Präparation wurden folgende Lösungen benutzt:

Tabelle 1

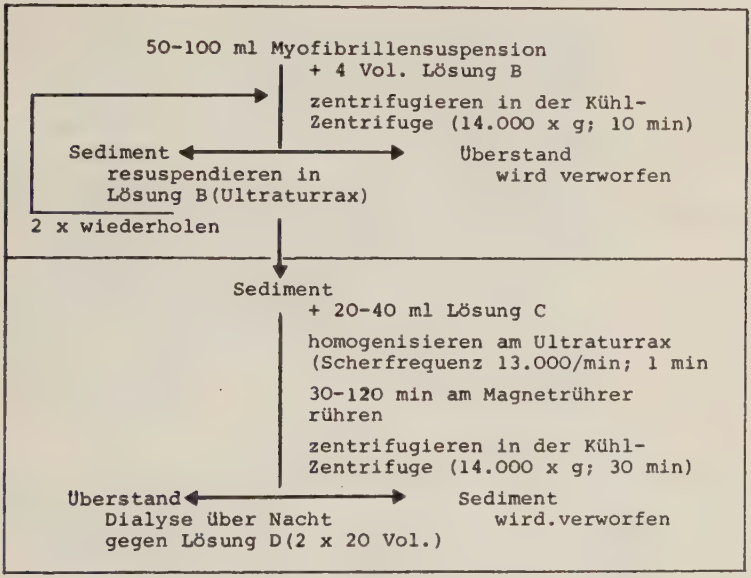
Lösung	A	B	C	D
Substanz	Endkonzentration			
Saccharose	0.3 M			
KCl	0.1 M	0.1 M	0.6 M	0.6 M
Imidazol.HCl	50 mM	50 mM		50 mM
Tris.HCl			50 mM	
EGTA	1 mM	1 mM		
Dithioerythrit	1 mM	1 mM		1 mM
Natriumazid	1 mM	1 mM		1 mM
ATP			2 mM	
pH	6.8	6.6	8.0	7.4

Aus je 2-3 Herzen frischgeschlachteter Schweine wurden insgesamt 6 Myofibrillenpräparate gewonnen. Die aufgeschnittenen Herzen wurden von Blut befreit und in gestoßenem Eis vom Schlachthof in das Labor transportiert. Die Kammermuskulatur wurde sorgfältig von Fett und Bindegeweben gereinigt und weiter in einem Küchenmixer (Moulinette^{R}, Moulinex, Köln) vorzerkleinert. Der Muskelbrei wurde bei 0-4°C folgendermaßen weiterbehandelt: Tabelle 2



Aus 50-100 ml der mindestens 2 Tage mit 50% Glycerin extrahierten Myofibrillenpräparate wurde 1 Tag vor der Superpräzipitationsmessung Aktomyosin nach folgendem Schema extrahiert:

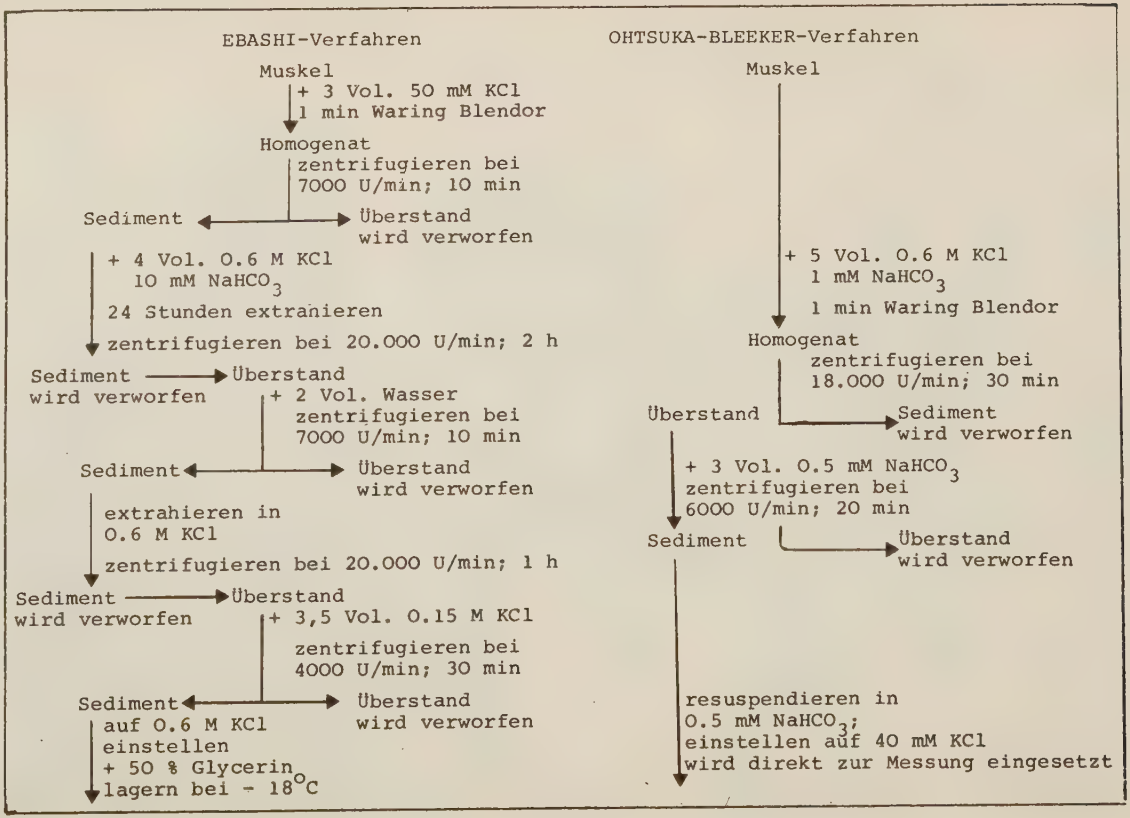
Tabelle 3



Die Dialyse gegen Lösung D führt zu einem Präparat mit ATP-Konzentrationen unter 10^{-6}M. Das Präparat wird zur Messung mit 50 mM Imidazol.HCl pH 7.4 (5 Vol.) verdünnt und an einem Zellhomogenisator mit Teflonstempel (Fa. Colora, Lorch) bei einer Drehgeschwindigkeit von 100/min für 1 min fein suspendiert. Diese Suspension wird im Eisbad aufbewahrt und innerhalb einiger Stunden für Superpräzipitationsmessungen verwendet.
Zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren wurden die Aktomyosin-Präparationsverfahren von EBASHI u. EBASHI(5), OHTSUKA(20) und das davon abgeleitete Verfahren von BLEEKER(1) nachgearbeitet.

Tabelle 4

Vergleich der Aktomyosinpräparationen nach EBASHI(5) und OHTSUKA(20)-BLEEKER(1)



Wie der Vergleich(S.10) der Verfahren dieser Autoren mit dem in unserem Labor üblichen Verfahren zeigt, werden hier Aktomyosinlösungen oder Aktomyosinsuspensionen erhalten, die im Verfahren nach EBASHI(5) durch Glycerinierung stabilisiert werden.

Der zeitliche Verlauf der Superpräzipitation wurde durch Trübungsmessung am Photometer Eppendorf verfolgt. Hierzu wurde der Turbidimetriezusatz mit einem temperierbaren Aluminiumblock als Küvettenhalter ausgestattet. Der Versuchsansatz wurde mit einem Küvettenmagnetrührer dauernd gemischt. Die Temperatur wurde mit einem Thermofühler vor dem Start der Reaktion kontrolliert. In einigen Experimenten wurde mit einer Flachmembran-Einstabmesskette der pH der Versuchsansätze während des Versuchsablaufs kontrolliert. Trübungsänderungen wurden als Extinktionsänderungen registriert und bei Geschwindigkeiten von 0.5-10 cm/min mit einem Philips-Registrierschreiber aufgezeichnet.

Wenn nicht anders angegeben, wurde folgender Versuchsablauf strikt eingehalten:

Tabelle 5

Minute	
0	2.5 ml Aktomyosinsuspension werden in die Normalküvette pipettiert
1	Zugabe des Ca-EGTA-Puffers(50 µl)
4	Zugabe von Mg-ATP(50 µl) zum Start der Reaktion

Die Reaktion wurde solange verfolgt, bis sich eine konstante Endtrübung eingestellt hatte.

Zur Einstellung der Ca-EGTA-Puffer wurde der Titer der EGTA-Stammlösungen gegenüber einem Ca^{++}-Titrisol mit Murexid als Indikator bestimmt(SCHWARZENBACH(25). Mg-ATP wurde entweder äquimolar oder wie in den Abbildungen angegeben dem Ansatz zugefügt. Der pH beider Lösungen wurde auf pH 7.4 oder entsprechend den Angaben in den Abbildungen vor Zugabe zum Bestimmungsansatz eingestellt.

Für orientierende Messungen zur Bestimmung der ATPase-Aktivität mittels potentiometrischer Titration wurde das extrahierte Aktomyosin gegen eine modifizierte Lösung D mit 10 mM Imidazol-HCl-Puffer dialysiert und durch Zugabe von bidestilliertem Wasser vorpräzipitiert und homogenisiert wie beschrieben. Nach dem beschriebenen Zeitprogramm wurde zu 5 ml Aktomyosinlösung 100 µl Ca.EGTA und zum Start der Reaktion 100 µl Mg.ATP zugesetzt. Die Titration mit 2-10 mN KOH erfolgte in einem temperierten Reaktionsgefäß auf dem Magnetrührer mit einem Methrohm (Herisau, Schweiz)-Titrator (pH-Meter E 512, Impulsomat E 473, Dosimat E 412 mit 2 ml Bürette und mechanischem Schreiber mit 1000 Skt). Der Titer wurde gegen 10 mN HCl bestimmt und für die pH-abhängige Dissoziation des ADP-ATP-Systems mit den Faktoren von GREEN u. MOMMAERTS (9) korrigiert.

In einigen Experimenten wurde den Bestimmungsansätzen 10 mM Creatin-phosphat zugesetzt. Die im System vorhandene hochaktive Creatin-phosphokinase bildet dann ein ATP-regenerierendes System, in dem die Gesamtaktivität der ATPase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und mit einer Kinetik scheinbar O. Ordnung gemessen werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

1. Grundverlauf und Phasen der Superpräzipitation von Aktomyosin aus dem Schweineherzen

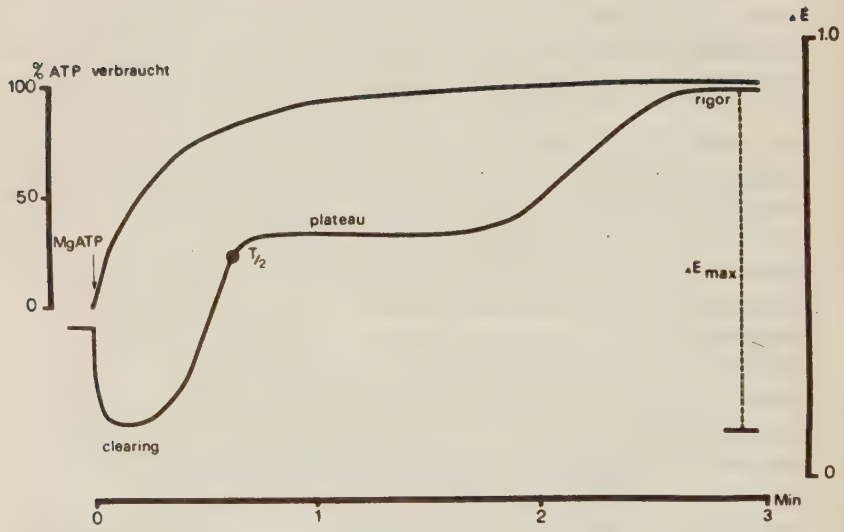
1.1 Turbidimetrische Bestimmungen

EBASHI und NONOMURA (7) beschreiben anhand elektronenmikroskopischer Befunde die einzelnen Phasen der Superpräzipitation von Skelettmuskelaktomyosin folgendermaßen (Abb. 2):

Bei Zusatz von Mg.ATP zu einer mit Ca.EGTA äquilibrierten Aktomyosinsuspension bei einer Ionenstärke von etwa 0.1 M kommt es zunächst zu einer Abnahme der Trübung der Suspension = clearing phase. Hierbei dissoziieren Aktin und Myosin-Oligomere. Dieser Phase kann ein langsamer Trübungsanstieg bis zu einem Plateau folgen, der durch die Reassoziation der Myosin-Oligomere zu Myosinfilamenten unterschiedlichen Assoziationsgrades gekennzeichnet ist = plateau phase. Dieser Phase folgt immer ein schneller Trübungsanstieg , der durch Bildung reversibler Aktomyosinkomplexe zustande kommt. In dieser Phase beschreiben die Autoren ein Maximum der ATPase-Aktivität (= -d ATP /dt). Nach Verbrauch der vorgegebenen ATP-Menge wird die maximale Trübung der Suspension (ΔE_{max}) erreicht unter Bildung großer, bereits makroskopisch sichtbarer Rigor-Komplexe = rigor state. Zur objektiven Auswertung dieses sehr komplizierten und je nach Bedingungen sehr variablen Kurvenverlaufs schlugen EBASHI u. EBASHI(5) die Zeit $\tau/2$ vor, die zwischen dem Start der Reaktion und dem Zeitpunkt verstreicht, zu dem die Hälfte der maximalen Trübung erreicht ist. Dieser Zeitpunkt kann, je nach der Länge der einzelnen kinetischen Phasen und der Höhe der dabei erreichten Trübung, an sehr unterschiedlichen Punkten der Reaktionskurve liegen.

Beim Herzaktomyosin finden wir unter geeigneten Bedingungen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf wie für das Aktomyosin aus Skelettmuskel (Abb. 3). Allerdings sind in dieser Kurve extrem hohe Konzentrationen an Mg.ATP (2×10^{-4}M) und Ca^{++} eingesetzt, um gleichzeitig die ATPase-Aktivität potentiometrisch bestimmen zu können.

Abbildung 3



Phasen des Superpräzipitationsverlaufs und ihre Korrelation zum ATP-Verbrauch während der Reaktion

Mg.ATP	2×10^{-4} M
Ca^{++}	5×10^{-5} M
Temperatur	$32^{\circ}C$

2. Orientierende Untersuchungen zur Kinetik der Aktomyosin-ATPase durch potentiometrische Titration

Der aus Abb. 2 ersichtliche Verlauf der ATP-Konzentration und die daraus errechenbare ATPase-Aktivität ließen hoffen, mit der potentiometrischen ATPase-Bestimmung ein von der Turbidimetrie unabhängiges Meßverfahren zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Superpräzipitation zu erhalten.

Insgesamt 74 orientierende Einzelversuche unter verschiedenen Konzentrationen von Mg.ATP(0.2 - 1.0 mM) und Ca^{++}(2×10^{-5} - 10^{-8}M) zeigten im Gegensatz zu den Angaben von EBASHI u. NONOMURA (7) niemals ein Maximum der ATPase-Aktivität im Bereich der schnellen 2. Anstiegsphase der Superpräzipitation von Herzaktomyosin. Vielmehr erhielten wir immer eine Reaktion scheinbar 1. Ordnung für die ATP-Hydrolyse, deren Anfangsgeschwindigkeit durch Zusatz von Kreatinphosphat über längere Zeit konstant gehalten werden und dann aus einer Kinetik scheinbar O. Ordnung statistisch sicher bestimmt werden konnte.

Bei paralleler Durchführung turbidimetrischer und potentiometrischer Experimente war gegenüber den Angaben von EBASHI u. NONOMURA(7) weiter auffällig, daß mit Erreichen der Endtrübung - insbesondere bei schneller Superpräzipitation - noch 70 - 10 % der eingesetzten ATP-Menge vorhanden sind, die unabhängig vom erreichten Trübungsgrad ebenfalls mit einer Gesamtkinetik scheinbar 1. Ordnung umgesetzt werden.

Besonders für die potentiometrische ATPase-Bestimmung gilt, daß sie wegen geringer Meßempfindlichkeit nur bei sehr hohen ATP-Konzentrationen durchgeführt werden kann. Wir mußten daher bis zum Einsatz besserer und empfindlicherer Methoden in niedrigen Konzentrationsbereichen (z.B. ATP-Bestimmung mit dem Luciferin-Luciferase-System) diese Untersuchungen zurückstellen.

3. Ausarbeitung eines Präparationsverfahrens für Aktomyosin aus dem Schweineherzen

Die Vorresultate von THEILE(29) und von FISCHER(8), haben bereits gezeigt, daß Aktomyosinpräparationen aus Kalbsherzen und aus dem menschlichen Herzen in ihrem Superpräzipitationsverhalten oft erheblich voneinander abweichen und sich zudem in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen und den Bedingungen bei der Extraktion von Aktomyosin aus Myofibrillenpräparationen ganz wesentlich unterscheiden können.

Erste Aufgabe dieser Arbeit war es daher, die Präparationsbedingungen so zu standardisieren, daß reproduzierbare Aktomyosinpräparate für vergleichende Untersuchungen verfügbar waren. Kriterien für eine erfolgreiche Präparation sind die Stabilität der Präparation und die Reproduzierbarkeit des Zeitverlaufs der Superpräzipitationsreaktion insbesondere unter unterschiedlichen Ca^{++}-Konzentrationen als Indiz für die Integrität der regulatorischen Proteine der Myofibrille (EBASHI u. EBASHI(5)).

Bereits die Behandlung des Muskelmaterials vor der Präparation kann Einfluß auf die Qualität des Aktomyosinpräparats haben. Während Kalbsherzen wegen Bolzenschußschlachtung zumeist in Diastole sistieren, bleiben Schweineherzen bei der üblichen Elektroschlachtung immer in Systole stehen. Die aus diesen Herzen gewonnenen Myofibrillen enthalten daher stark überlappte Aktomyosinkomplexe, die erfahrungsgemäß wesentlich schwieriger zu extrahieren sind als die Aktomyosinkomplexe eines diastolischen Muskels (RÜEGG(24); HASSELBACH(10)). Dies ist vorallem für die Modifikationen bei der Aktomyosinextraktion aus Myofibrillen von Bedeutung.

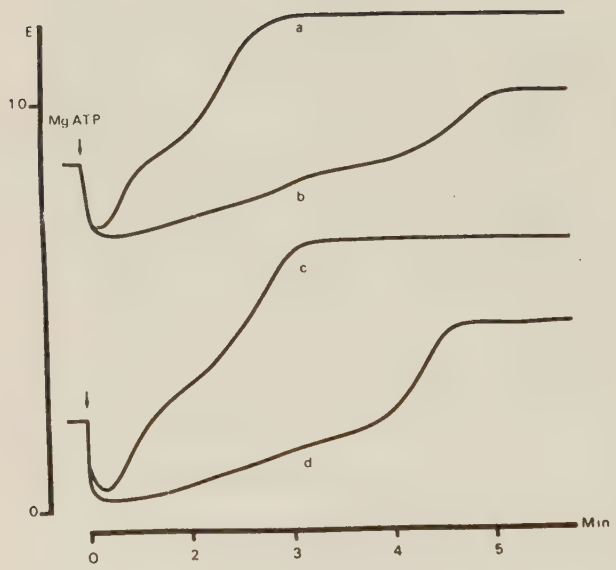
Herzmuskelgewebe enthält weiter relativ hohe Aktivitäten an proteolytischen Enzymen, die vorallem die regulativen Proteine im Aktomyosin sehr schnell abbauen können. Diese Abbauprozesse lassen sich nur durch möglichst baldige Kühlung des Herzgewebes nach dem Tode des Tieres, durch möglichst rasche Aufarbeitung des Materials und möglichst vollständige Extraktion cytosolischer Enzyme begrenzen. Wir erhielten die Herzen in einem Zeitraum von 10-20 min nach Schlachtung der Tiere und zerschnitten das Kammermyocard in gestoßenem Eis. Das Material wurde in schmelzendem Eis vom Schlachthof in das Labor transportiert. Die Anregung, das Herz bereits auf dem Transport in einer cardioplegen Lösung vor Nekroseprozessen zu schützen, ergab in mehreren Versuchen keine Unterschiede im Superpräzipitationsverhalten des aus diesen Herzen präparierten Aktomyosins. Dabei wurden folgende Bedingungen untersucht:

a) Transport von zerschnittenem Kammermyocard in schmelzendem Eis
b) Transport von zerschnittenem Kammermyocard in eiskalter Krebs-Henseleit-Lösung ohne Ca^{++}
c) Transport von grob homogenisiertem Kammermyocard in eiskalter Vorextraktions-Lösung A(s. Tab. 1)

Abb.4 zeigt das Ergebnis eines Experiments, in dem von 2 Herzen eines nach Methode a, eines nach Methode c transportiert wurde. Nach getrennter Aufarbeitung der Herzen besteht kein Unterschied der hieraus gewonnenen Aktomyosinpräparationen.

Auch Membrankomponenten sind aus Herzmuskel in Systole schwieriger zu extrahieren als in Diastole. Man erkennt grob aus Färbung und Schichtung der Sedimente bei der Extraktion in Lösung A, wieweit die Abtrennung von Myoglobin und Mitochondrien in den ersten Fraktionierungsschritten gelingt. Ohne zunächst zu quantifizieren, erhöhten wir die Zahl der Extraktionsschritte in Lösung A von 2 auf 5; es zeigte sich jedoch, daß man nach 4 Extraktionen keine weitere Verbesserung der Myofibrillenpräparate erreicht. Nach Extraktion mit Lösung B (Tab. 1) in 3 Schritten

Abbildung 4



Einfluß der Transportbedingungen auf die Präparation funktionsfähiger Aktomyosinpräparate

A,B	Transport in Eis	Ca^{++}	A,C	10^{-5}M
C,D	Transport in Lösung A		B,D	10^{-6}M
		Mg.ATP		2 x 10^{-6}M

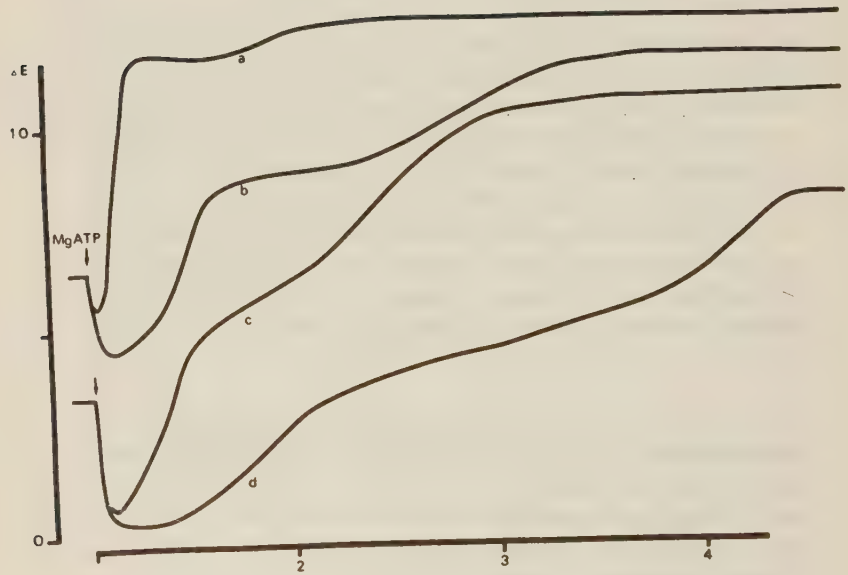
Die Ca^{++}-Sensitivität ist für beide Präparate etwa gleich.

ergibt sich ein farbloser Überstand mit geringem Proteingehalt und ein fast farbloses Sediment. Dennoch ist nach der 2tägigen Glycerinbehandlung der Myofibrillen der Zentrifugationsüberstand oft noch braun verfärbt, was auf dem Effekt dieses Verfahrens beruht, restliche Membranorganelle der Muskelfaser aufzulösen.

Ein ganz wesentlicher Faktor für die Funktionsfähigkeit des aus Schweineherzen präparierten Aktomyosins, insbesondere für die Erhaltung der regulativen Proteine, ist die Erniedrigung der pH-Werte bei der Vorextraktion. In unseren ersten Präparationen arbeiteten wir bei pH 7.2-7.4 und erhielten neben hohen Proteinkonzentrationen in den Vorextraktionsüberständen schließlich Aktomyosinpräparate ohne Ca^{++}-Sensitivität. Erst die Erniedrigung des pH-Wertes auf 6.8-6.6 während der Vorextraktion führte zu einer reproduzierbaren Ca^{++}-Sensitivität des präparierten Aktomyosins.

Die Proteinausbeuten und die Funktionsfähigkeit des präparierten Aktomyosins sind weiter stark abhängig von der ATP-Konzentration in der Lösung C (Tab.1). Die sehr niedrigen Ausbeuten in Verfahren wie dem nach EBASHI(5) oder OHTSUKA(20) aus systolischem Kammermyocard vom Schwein beruhen in erster Linie auf dem Mangel an ATP bei dem Extraktionsschritt bei hoher Ionenstärke (s.a. SZENT-GYÖRGYI(28). Variiert man die ATP-Konzentration bei Extraktion mit Lösung C zwischen 1-10 mM ATP, so steigt die Proteinausbeute an. Bei Konzentrationen über 2 mM ATP verändert sich andererseits das Superpräzipitationsverhalten des Aktomyosins: es treten nur noch clearing-Effekte auf, jedoch kein Plateauanstieg und keine Bildung größerer Aktomyosinaggregate während der Rigorphase. Durch Erhöhung der ATP-Konzentration wird im wesentlichen Myosin extrahiert, während der Hauptteil des Aktins und der assoziierten Proteine in der Fibrille verbleibt.

Abbildung 5



Vergleich des Präparationsverfahrens nach EBASHI (5) mit dem hier geschilderten Standardverfahren (sh. Tab. 1-3)am 1. Tag nach der Präparation. Am 2. Tag nach der Präparation ist das Präparat nach EBASHI vollständig inaktiv, während das Präparat nach Standardverfahren wenigstens 4 Tage stabil bleibt(sh. Abb. 7).

Ca^{++} A,C 10^{-5} M Mg.ATP 2×10^{-6} M
B,D 10^{-6} M

A,B Verfahren nach EBASHI
C,D Standardverfahren

Die mit diesem Verfahren(Tab.2 und 3) erhaltenen Aktomyosinpräparationen waren immer farblos. Die elektronenmikroskopische Prüfung zeigt nur wenige Membranfragmente.

Die Präparate dürfen keinerlei Glycerin aus den vorhergehenden Präparationsschritten enthalten, da Glycerin die Superpräzipitation hemmt. Die ATP-Konzentration nach Dialyse gegen Lösung D (Tab.1) und weiterer Verdünnung vor der eigentlichen Messung liegt unter 1 µM.

Neben den Nachteilen sehr geringer Ausbeute erweisen sich die Vergleichsverfahren der Tab.4 auch sonst für die Präparation von Aktomyosin aus dem Schweineherzen als unbrauchbar. Mit dem Verfahren nach OHTSUKA(20) erhalten wir keine Superpräzipitation des Aktomyosins(2 Versuche) und des Aktomyosins aus Meerschweinchenherz(6 Versuche). Aktomyosin aus Präparationen nach EBASHI(5) zeigt am 1. Tag nach der Präparation eine ganz ähnliche Superpräzipitations-charakteristik wie das Aktomyosin nach dem hier ausgearbeiteten Standardverfahren (Abb.5). Diese Präparate sind jedoch am folgenden Tag vollkommen inaktiv (2 Versuche).

Zusammenfassend gelten unter den gegebenen Randbedingungen folgende Grundregeln für die Präparation funktionsfähigen Aktomyosins aus dem Schweineherzen:

1) Transport vom Schlachthof in schmelzendem Eis ist zureichend, Transport in cardioplegen Lösungen nicht notwendig.
2) 4malige Vorextraktion des Muskelhomogenats in Lösung A bei pH 6.8, 3malige Extraktion bei pH 6.6 in Lösung B und anschließende 2tägige Glycerinierung reichen zur Entfernung membranärer Bestandteile der Muskelfaser aus. Entfernung von Glycerin vor Aktomyosinextraktion ist erforderlich

3) Ein optimaler Kompromiß für die Extraktion des Aktomyosins ist Behandlung mit 2 mM ATP in 0.6 M KCl und Pufferung auf pH 7.6-8.0
4) Der Dialyseschritt muß die ATP-Konzentration des Aktomyosin-Sols unter 1 µM senken.
5) Für die Aufbewahrung des Materials ist es wesentlich günstiger, glycerinierte Myofibrillen zu verwenden als glyceriniertes Aktomyosin.

Abbildung 6

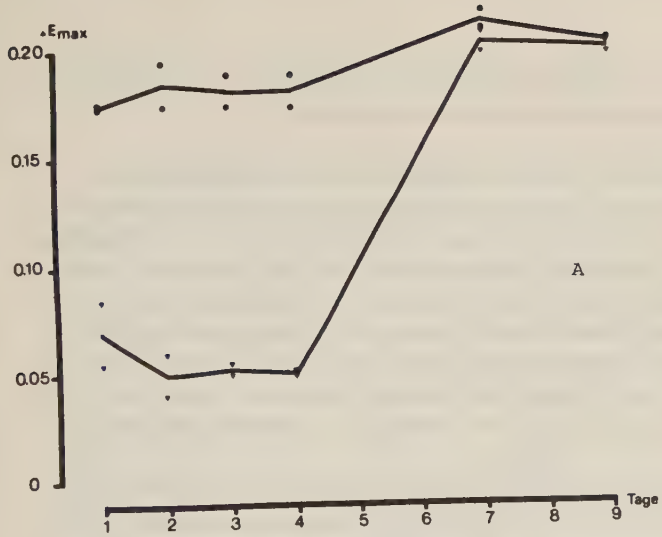
Calciumsensitivität als Qualitätskriterium für die Stabilität der Aktomyosin-Präparationen, gemessen an

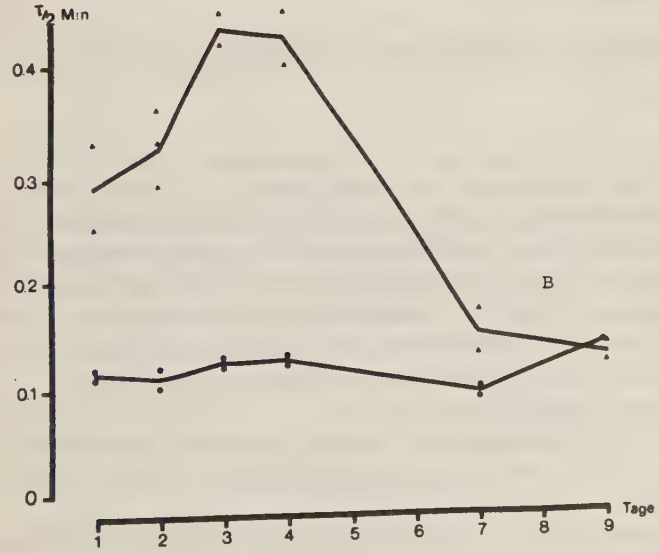
(a) der maximalen Superpräzipitationshöhe
(b) der Halbwertszeit der Superpräzipitation

in Abhängigkeit von der Zeit nach der Präparation

Ca^{++} ● 10^{-5} M ▲ 10^{-6} M Mg.ATP 2×10^{-6} M

Abbildung 6


Emax
0.20
0.15
0.10
0.05
0
A
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Tage


T½ Min
0.4
0.3
0.2
0.1
0
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Tage

3. Einfluß der Temperatur und des Ionenmilieus auf die Superpräzipitation von Herzaktomyosin

Der beschriebene typische Verlauf der Superpräzipitation in 4 Phasen wird durch die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit und das Ionenmilieu stark beeinflußt. Unter inadäquaten Bedingungen kann die Trübungsentwicklung so verlaufen, daß die einzelnen Phasen des Prozesses ineinander übergehen und nicht unterschieden werden können. Für die beabsichtigten Untersuchungen waren deshalb die Bedingungen festzulegen, unter denen alle Phasen der Superpräzipitation gut charakterisierbar und sicher voneinander zu unterscheiden sind.

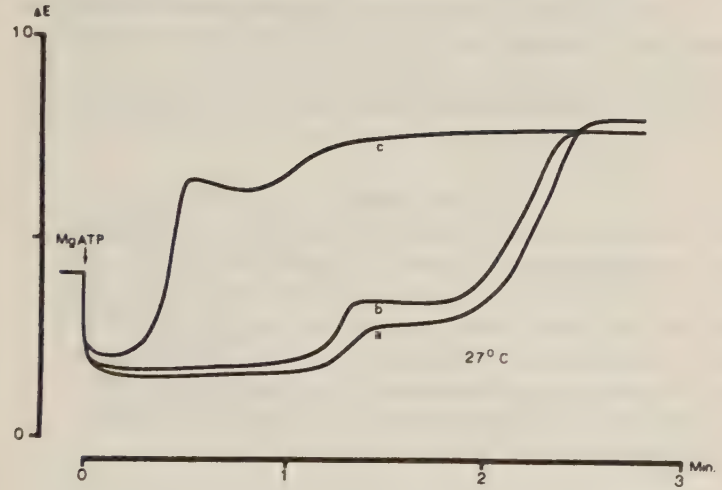
Im folgenden werden nur diejenigen Ergebnisse der Untersuchungen beschrieben, die sich nach Standardisierung der Präparationsmethodik als reproduzierbar in wenigstens 2 der 6 Aktomyosin-Standardpräparationen erwiesen haben und die die Darstellung aller Phasen der Superpräzipitationskinetik optimal erlaubt.

3.1 Einfluß der Vorwärmzeit auf die Superpräzipitationskinetik

Wie bereits im methodischen Teil geschildert, wurden alle Messungen der Superpräzipitationskinetik unter einem streng definierten Zeitprogramm durchgeführt. Grund hierfür ist eine Veränderung der Eigenschaften des vorpräzipitierten Aktomyosin bei Erwärmung (Abb.7). Erwärmt man eine Aktomyosinsuspension von $0^{\circ}C$ ausgehend auf $27^{\circ}C$ oder $32^{\circ}C$, so nimmt sie nach 3 Minuten die vorgegebene Temperatur an und verändert dann im Verlaufe weiterer 10 Minuten ihr Verhalten auch ohne Zugabe von ATP:

a) Die Extinktionsabnahme bei Zugabe von Mg-ATP vermindert sich, uU. bis zum vollständigen Ausbleiben einer clearing phase.
b) Die Halbwertszeit für den ersten Trübungsanstieg vermindert sich auf 1/3 des zunächst gemessenen Wertes.

Abbildung 7



Abhängigkeit der Superpräzipitation von der Vorwärmzeit bei Versuchstemperatur 27°C. Die Vorwärmzeit rechnet vom Zeitpunkt des Pipettierens der eiskalten Lösung in die temperierte Küvette bis zur Zugabezeit für Mg.ATP . Die Versuchstemperatur wird nach 3 min erreicht.

Ca^{++} 10^{-6}M Vorwärmzeit: A 3 min

Mg.ATP 2 x 10^{-6}M B 6 min

C 11 min

c) Im Verlauf des 1. Trübungsanstiegs kommt es zu einer übermäßigen Trübungszunahme, die dann zum Trübungsplateau wieder abnimmt ("overshoot")
d) Die Trübungszunahme des 1. Trübungsanstiegs wird insgesamt größer als bei kurzer Vorwärmdauer
e) Die Zeitdauer der Plateauphase vermindert sich um 10-20%.
f) Die 2. Anstiegsphase beibt zwar ungefähr gleich lang, zeigt aber entsprechend der vorausgegangenen Kinetik unterschiedliche Steilheit
f) Lediglich die endgültige Superpräzipitationstrübung bleibt etwa konstant.

Geht man von der Deutung von EBASHI u. NONOMURA (7) aus, so muß bereits vor der Zugabe von Mg.ATP zum Reaktionsansatz ein temperaturabhängiger Prozess stattfinden, der die Kinetik des ersten Trübungsanstiegs beschleunigt und damit ein maximales clearing nicht zuläßt. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Vorbedingung für eine sehr schnelle Neuformierung geordneter Myosinstrukturen und damit für den schnellen Eintritt der reversiblen Aktin-Myosin-Interaktion in der Plateauphase.

Diese Effekte sind relativ gering bei Vorwärmdauern von 3 und 6 Minuten, werden danach aber bestimmend für den Zeitverlauf der Superpräzipitation. Das gewählte Zeitprogramm beschränkt also bereits die Aussagen auf einen Zustand des Aktomyosingels kurz nach Erreichen der gewählten Reaktionstemperatur, die üblicherweise 32°C betrug. Als Vorwärmdauer wurden 4 Minuten gewählt.

3.2 Temperaturabhängigkeit der Superpräzipitation

Die Temperaturabhängigkeit der Superpräzipitation wurde zwischen 19°C und 43°C untersucht. Abb. 9 gibt alle Kurven eines repräsentativen Experiments, bei dem jede Einzelkurve in 3 Einzelversuchen bestätigt wurde. Ganz ähnliche Ergebnisse wurden mit 2 weiteren Aktomyosinpräparaten erhalten.

Folgende typische Ergebnisse zeigt die Abbildung:

a) Im Rahmen der Meßgenauigkeit bestehen nur geringe Unterschiede in der Anfangskinetik der Clearing-phase im Temeraturbereich zwischen 19°C und 34°C.

   Die bestehenden Unterschiede können nur bei sehr schneller Registrierung der Clearing-Phase überhaupt erfasst werden. Sie verlaufen nur im Anfangsteil nach einer Kinetik 1. Ordnung. Die Kinetik wird bei der gegebenen Versuchsanordnung überlagert durch den Zumischvorgang bei der Zugabe von Mg-ATP und ist mit der hier verwendeten Versuchsanordnung nicht störungsfrei zu untersuchen.

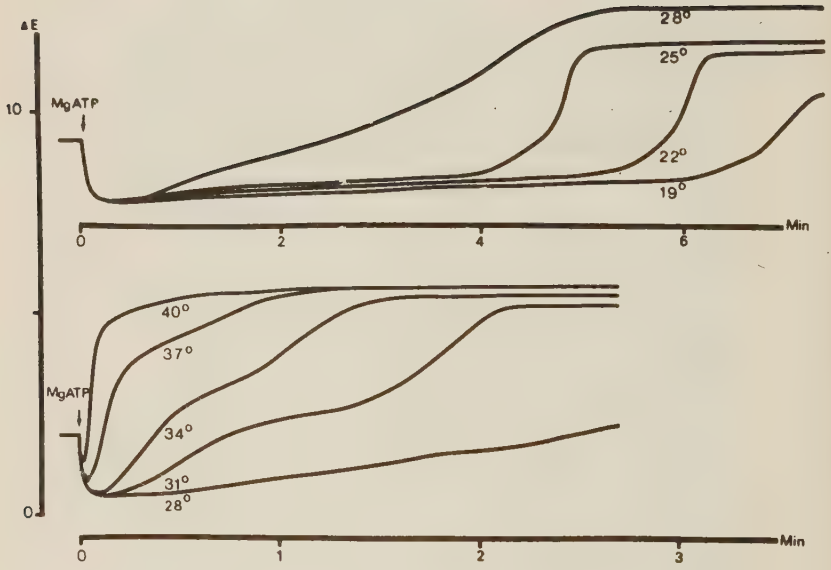
b) Zwischen 19°C und 25°C bildet sich keine Plateauphase aus. Das kann 2 Gründe haben:
   - Die Geschwindigkeit und Höhe des 1. Trübungsanstiegs ist so gering, daß die durch die Clearing-Phase verminderte Trübung ungefähr gleich der Trübung der Plateau-Phase ist.
   - Die Ausbildung der Plateauphase ist so verzögert, daß sie erst unmittelbar vor dem 2. Trübungsanstieg eintritt und direkt in diesen übergeht.

   Wahrscheinlich ist die 1. Deutungsmöglichkeit richtig, da sich die maximale Trübungsverminderung in der Clearing-Phase geringfügig im weiteren Verlauf ändert. Jedenfalls ist eine Abgrenzung der ersten Phasen des Prozesses nicht möglich. Das erhaltene Bild entspricht recht genau der schematischen Abbildung von EBASHI u. NONOMURA(7)(Abb. 2).

c) Der 1. Trübungsanstieg und die Ausbildung eines Plateaus findet erst oberhalb von 27°C statt. Eine deutliche Unterscheidung dieser Phasen ist zwischen 31°C und 35°C gut gegeben.

d) Oberhalb 35°C kommt es zu einem Übergang zwischen der Clearing-Phase und dem 1. Trübungsanstieg. Bei unvollständigem clearing erhöht sich gleichzeitig die im ersten Trübungsanstieg erreichte Extinktionshöhe so, daß eine Abgrenzung der Plateauphase nicht sicher möglich ist. Bei 40°C geht der 1. Trübungsanstieg fast direkt in die endgültig erreichbare maximale Trübungshöhe über.

Abbildung 8



Temperaturabhängigkeit der Superpräzipitationskinetik zwischen 19 und 40°C. Vorwärmzeit: 4 min.
Ca^{++} 10^{-6}M
Mg.ATP 2×10^{-6}M

Beachte die unterschiedlichen Zeitmaßstäbe im oberen und unteren Teil der Abbildung.
Erläuterungen im Text.

e) Bei 31°C entspricht die maximale Trübung 95% der bei 40°C erreichbaren Trübung. ΔE_{max} hat einen sigmoiden Temperaturgang.

f) $\tau/2$ fällt von 420 Sekunden bei 19°C auf 6 Sekunden bei 40°C (Abb.8). Diese Relativwerte sind stark von der Proteinkonzentration abhängig und können daher nur innerhalb einer Versuchsreihe verglichen werden.

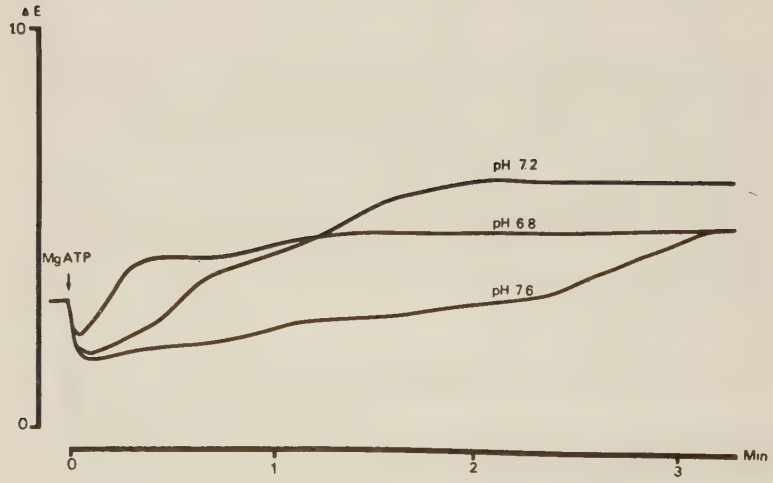
Da in unserem Hause aus Stabilitätsgründen fast alle Untersuchungen an intakten Herzmuskelpräparaten bei 32°C durchgeführt werden und bei dieser Temperatur die einzelnen Phasen der Superpräzipitation gut unterschieden werden können, wurden alle weiteren Parameter bei dieser Temperatur getestet. Das schließt nicht aus, daß man für die genauere Untersuchung der einzelnen Phasen der Superpräzipitation andere Temperaturbereiche, insbesondere niedrigere Temperaturen bevorzugen sollte.

3.3 Abhängigkeit der Superpräzipitationskinetik vom pH

Die pH-Abhängigkeit der Superpräzipitationskinetik wurde nur in einem engen Bereich von pH 6.8 - 7.6 mehrfach geprüft. Einzelversuche bei pH 5.5, pH 6.5, pH8.0 und pH 9.0 haben zusätzlich die bereitsbekannte Tatsache bestätigt, daß ein phasisches Superpräzipitationsverhalten nur in der Nähe des sehr engen pH-Optimums der Aktomyosin-ATPase von pH 7.3 mit einer Halbwertsbreite von $\pm$ 0.3 pH-Einheiten zu erwarten ist (GREEN u. MOMMAERTS (9). Als reproduzierbar ergaben sich mit 3 unterschiedlichen Aktomyosinpräparationen folgende Charakteristika:

a) Bei pH-Werten oberhalb des pH-Optimums (pH 7.6 - 8.0) ist die Aktomyosin-Dissoziation in der Clearing-Phase begünstigt. Es kommt zu einer unscharfen Ausbildung des 1. Trübungsanstiegs und der Plateauphase, zu einer geringen Anstiegsgeschwindigkeit des 2. Trübungsanstiegs und zu einer Verminderung von ΔE_{max}.

Abbildung 9



Abhängigkeit der Superpräzipitationskinetik vom pH

Ca^{++} 10^{-6}M
Mg.ATP 2×10^{-6}M
Der pH des Ansatzes wurde durch Zugabe von einigen µl 0.1 N KOH eingestellt und über die Versuchszeit mit einer Flachmembranelektrode kontrolliert. Er sinkt während der Messung um maximal 0.05 pH-Einheiten.

b) Im Bereich des pH-Optimums (pH 7.2 - pH 7.4)ist die Trübungsänderung in der Clearing-Phase geringfügig vermindert. Der Anstieg zum Plateau zeigt oft mehrere Phasen (sh. Abb. 10). Die Plateauphase geht oft schnell in den 2. Trübungsanstieg über. Es wird die maximale Endtrübung erreicht.

c) Bei pH-Werten unterhalb des pH-Optimums der Aktomyosin-ATPAse ist die Dissoziationsphase der clearing-Reaktion oft unvollständig, der Anstieg zum Plateau beschleunigt. Häufig findet man "overshoots"(sh. auch Kap. 3.1). Die Plateauphase ist kurz und geht schnell in den flachen 2. Trübungsanstieg über. Auch hier wird die maximale Endtrübung - wie oberhalb des pH-Optimums - nicht erreicht. ΔE_{max} liegt 30% unterhalb des erreichbaren Maximalwertes.

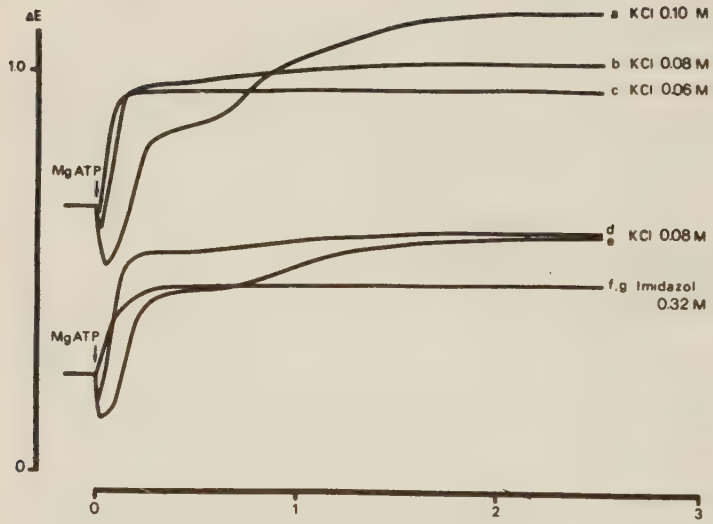
Dieses Verhalten macht eine optimale Pufferung der Versuchsansätze erforderlich. Die ATP-Hydrolyse führt im pH-Bereich von pH 7.2-7.4 ohne Pufferung zu erheblichen pH-Verschiebungen, die wir durch Pufferung mit Imidazol-HCl-Puffern auf $<$ 0.05 pH-Einheiten begrenzen konnten. Zur Kontrolle wurden die pH-Werte der Ansätze vor und nach Ablauf einer Superpräzipitationsreaktion regelmäßig überprüft. Für die folgenden Experimente wurde regelmäßig ein Anfangs-pH-Wert von 7.4 eingehalten.

3.4 Einfluß der Ionenstärke auf die Superpräzipitationskinetik. Einfluß von K^+ und Imidazol.

Seit langem ist bekannt, daß Na^+ die Superpräzipitation von Aktomyosin hemmt, K^+ sie begünstigt, ganz parallel zu der Empfindlichkeit der Aktomyosin-ATPase gegenüber Na^+ und K^+-Ionen. Insofern wurde von vornherein nur die Konzentrationsabhängigkeit gegenüber K^+-Ionen untersucht. Der Ausgangspunkt dieser Untersuchung war die überraschende Feststellung, daß

a) in Abwesenheit von K^+-Ionen keine Clearing-Phase aus-

Abbildung 10



Abhängigkeit der Superpräzipitationskinetik von der KCl-Konzentration und der Verlauf in K^+freier Lösung.
Die Leitfähigkeit der K^+-freien Lösung Imidazol.HCl (0.32 M) entspricht der einer 0.1 M KCl-Lösung.

Ca^{++} 10^{-5}M (a,b,c,d,f)
10^{-6}M (e,g)

Mg.ATP 2×10^{-6}M

gebildet wird. Es kommt vielmehr sofort zu einem Trübungsanstieg, der zu einer maximalen Superpräzipitations-Trübung führt, die allerdings je nach der Ionenstärke des Imidazolpuffers sehr unterschiedlich sein kann. Reproduzierbar ist der Befund der Unterdrückung einer Clearing-Phase ohne K^+.

b) Bereits geringe K^+-Konzentrationen führen zur Ausbildung einer Clearing-Phase, bevorzugt bei niedriger Ca^{++}-Konzentration.

c) Eine reproduzierbar starke Ausbildung der Clearing-phase ohne wesentliche Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration wird erst bei 0.1 M KCl erreicht. Bei weiterer Erhöhung der K^+-Konzentration kommt es zu einer starken Verlängerung der Clearing-Phase.

d) Die maximale Superpräzipitationstrübung wird ebenfalls bei 0.1 M KCl erreicht. Eine weitere Erhöhung der K^+-Konzentration läßt ΔE_{max} wieder abnehmen.

Diese Befunde sind für eine unserer Aktomyosinpräparationen in Abb.10 zusammengestellt. Aus der Abb. könnte der Eindruck entstehen, daß in Imidazol.HCl unter Ausschaltung der Clearing-Phase ein Trübungsanstieg direkt auf die Plateau-Trübung entsteht, also diese Phase isoliert aus dem komplexen Geschehen der Superpräzipitation betrachtet werden könnte. Dies hat sich aber bei der Untersuchung von 4 weiteren Aktomyosinpräparaten nicht bestätigen lassen.
Die optimale Ausbildung aller Phasen der Superpräzipitation wird bei 0.1 M KCl erreicht, und wir haben alle weiteren Untersuchungen bei dieser K^+-Ionen-Konzentration vorgenommen.

3.5 Ca^{++}-Sensititivität und Einfluß von Ca^{++} auf die Superpräzipitationskinetik

Die Ca^{++}- Sensitivität von Aktomyosinpräparationen ist Ausdruck für die Funktionsfähigkeit der regulatorischen Proteine, insbesondere des Tropomyosin-Troponin-Systems, und war Ausgangspunkt für die Prüfung der Funktion dieser

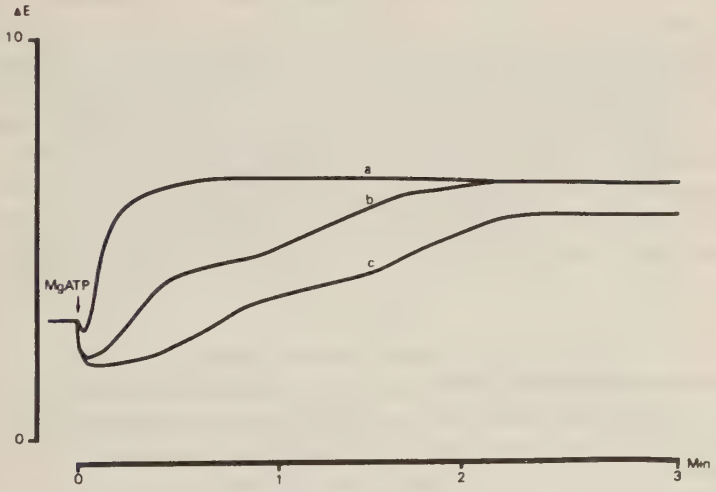
Regulatorproteine mithilfe der turbidimetrischen Messung der Superpräzipitationskinetik (EBASHI u.EBASHI(5)). Beispiele für diese Funktionsprüfung bieten die bereits gegebenen Abbildungen 4,5 und 6.
Dabei ist zu beachten, daß Mg^{++} antagonistisch zu Ca^{++} den Superpräzipitationsprozeß beeinflußt. Die Prüfung der Ca^{++}-Sensitivität ist somit abhängig von der vorgegebenen Konzentration an Mg.ATP, die für die folgenden Experimente bei 2×10^{-6} gehalten wurde.
Nur solche Präparate, die bei der vorgegebenen Mg.ATP-Konzentration Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Superpräzipitationskinetik bei 10^{-6} M Ca^{++}_{fr} gegenüber 10^{-5}M Ca^{++}_{fr} aufwiesen, wurden in unsere Untersuchungen miteinbezogen. Die entsprechenden Ca^{++}-EGTA-Lösungen wurden nach PORTZEHL et. al.(22) und RÜEGG (24) in der Ausgangskonzentration von 1 mM Ca.EGTA erhalten. Darüberhinaus wurden alle Präparate auf ihr Verhalten gegenüber reinem EGTA geprüft.

In Ergänzung zu den Befunden der Abb. 4, 5 und 6 zeigt Abb. 11 das kinetische Verhalten einer Aktomyosinpräparation unter verschiedenen Ca^{++}_{fr}-Konzentrationen:

a) Bei $\underline{10^{-7}M}$ Ca^{++}_{fr} erhält man maximale Ausbildung der Clearing-Phase. Auch der völlige Ca^{++}-Entzug unter EGTA führt nicht zu einer weiteren Verstärkung des Trübungsabfalls. Der 1. Trübungsanstieg bis zum Plateau ist gegenüber höheren Ca^{++}-Konzentrationen verlangsamt. Das Plateau wird ausgebildet, aber niedriger als bei höheren Ca^{++}-Konzentrationen. Der 2. Trübungsanstieg verläuft mit gleicher Steilheit wie bei 10^{-6}M Ca^{++}_{fr}, aber auf einen niedrigeren Wert von E_{max}.

b) Bei $\underline{10^{-6}M}$ Ca^{++}_{fr} überlappen bereits die Clearing-Reaktion und der 1. Trübungsanstieg. Inflogedessen wird ein maximales Clearing nicht erreicht. Die Plateauphase ist deutlich ausgebildet und gegenüber niedrigeren Ca^{++}-Konzentrationen erhöht. Die Geschwindigkeit des 2. Trübungsanstiegs entspricht der bei $Ca^{++}_{fr} = 10^{-7}$M, führt aber zur maximalen Endtrübung.

Abbildung 11



Einfluß der Konzentration freier Ca^{++}-Ionen auf die Kinetik der Superpräzipitation.
Bei Ca^{++}-Entzug in reiner EGTA-Lösung zeigen sich nach dem Clearing keine Anstiegsphasen.

Ca^{++}	10^{-5} M (a)	Mg.ATP	2×10^{-6} M
	10^{-6} M (b)	KCl	0.1 M
	10^{-7} M (c)		

Vergl. hierzu Abb. 4,5,6

c) Unterschiede weisen die verschiedenen Aktomyosinpräparate gegenüber einer Ca^{++}_{fr}-Konzentration von 10^{-5}M auf. In 4 Präparationen war hier die Clearingphase noch deutlich ausgeprägt, in 2 weiteren Präparationen kaum sichtbar (Abb. 11). In diesen Fällen wird auch kein Plateau ausgebildet, sondern direkt die Maximaltrübung erreicht. Abb. 4 und 5 zeigen jedoch, daß dies nicht der Normalfall sein muß. Hier sind mindestens Ansätze zu einer Plateauphase sichtbar.

Ohne einer Analyse der einzelnen Phasen der Superpräzipitationskinetik vorgreifen zu wollen, scheint Ca^{++} vorallem die Phase des 1. Trübungsanstiegs zu beschleunigen. Dadurch vermindert sich scheinbar die Clearing-Reaktion, und die Plateauhöhe wird früher erreicht. Dies wirkt sich weiter auf die Dauer des Plateaus und schließlich auf den 2. Trübungsanstieg aus, der bei hohen Ca^{++}_{fr} dem ersten Trübungsanstieg direkt folgt.

Dieses Verhalten ist sehr stark abhängig vom Alter der Aktomyosinpräparation (Abb. 7). In den ersten 4 Tagen nach Präparation des Aktomyosins aus glyzerinierten Myofibrillen bleiben sowohl $\tau/2$ als auch ΔE_{max} nahezu konstant, während nach 7 Tagen die Ca^{++}-Sensitivität vollständig verloren geht. Dies ist wahrscheinlich der Denaturierung der regulatorischen Proteine zuzuschreiben. Kinetische Untersuchungen wurden deshalb nur an Präparationen ausgeführt, die höchsten 3 Tage alt waren. In glycerinierten Fibrillen bei - 20°C bleibt die Ca^{++}-Sensitivität länger als 6 Monate erhalten, in glyceriniertem extrahierten Aktomyosin bei - 20°C jedoch höchstens 4 Wochen.

3.6 Einfluß von Mg^{++} und ATP auf die Superpräzipitations-Kinetik. Äquivalenz von Mg^{++} und ATP

MARUYAMA u. WATANABE(17) haben zeigen können, daß der Chelatkomplex Mg.ATP das eigentliche Substrat der Aktomyosin-ATPase darstellt. Man sollte daher annehmen, daß auch im myofibrillären Raum ATP und Mg^{++} in äquivalenten Mengen auftreten. Die verschiedensten Abschätzungen über die bei der Myofibrillenkontraktion auftretenden ATP-Mengen führen zu sehr divergierenden Vorstellungen. Wir haben im Verlaufe dieser Untersuchungen die Mg^{++}- und ATP-Konzentrationen um mehrere Zehnerpotenzen variiert, mit dem Ziel, solche Bedingungen zu finden, bei denen alle Phasen der Superpräzipitation optimal unterscheidbar dargestellt werden können (vgl. auch Abb.3).

Sehr hohe Konzentrationen an Mg.ATP (10^{-3}-10^{-4}M) führen

---

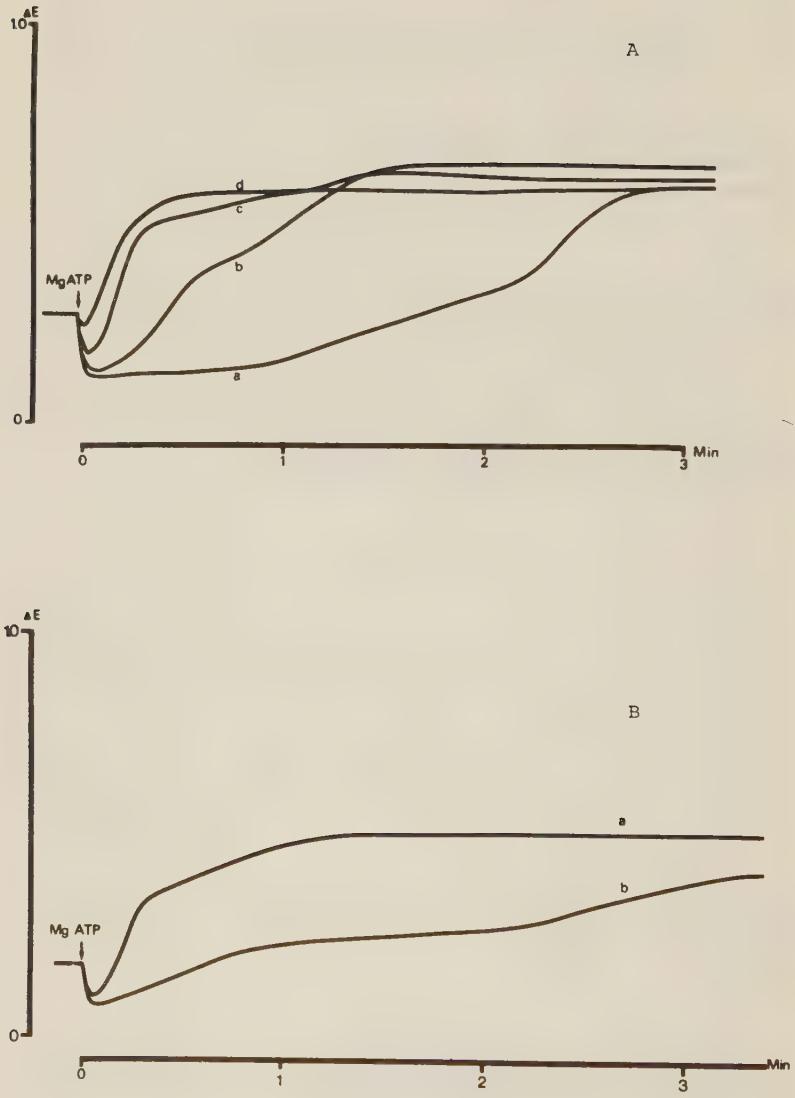
Abbildung 12 A,B

Veränderungen der Superpräzipitationskinetik bei Variation der relativen Konzentrationen von Mg^{++} (A) und ATP (B).

A (obere Abbildung)			
konstant: 0.1 M KCl		variabel: Mg^{++}	6×10^{-6}M (a)
ATP	2×10^{-6}M		2×10^{-6}M (b)
Ca^{++}	10^{-6}M		6×10^{-7}M (c)
			2×10^{-7}M (d)
B (untere Abbildung)			
konstant: 0.1 M KCl		variabel: ATP	6×10^{-6}M (a)
Ca^{++}	10^{-6}M		2×10^{-6}M (b)
Mg^{++}	2×10^{-6}M		

Die Kurven wurden mit verschiedenen Aktomyosinpräparationen aufgenommen. Insofern zeigt sich ein Unterschied zwischen den Kurven (b) in beiden Abbildungsteilen.

Abbildung 12



in aller Regel zu einer sehr kurzen Clearing-Phase, gefolgt von einem sofortigen Anstieg auf die endgültige Superpräzipitationshöhe. In solchen Fällen haben wir gleichzeitig titrimetrisch den ATP-Verbrauch bestimmen können. Es zeigt sich dabei, daß während des gesamten Anstiegs höchstens 30 % der vorgegebenen ATP-Menge hydrolysiert wird, die verbleibende ATP-Menge aber erst dann, wenn bereits die Maximaltrübung erreicht ist. Diese Vorstellungen stimmen noch weniger mit dem von EBASHI u. NONOMURA (7) gegebenen Modell überein. Es gelang auch bei so hohen Konzentrationen an Mg-ATP in der Regel nicht, eine abgesetzte Plateau-Phase zu erhalten, es sei denn durch extreme Erhöhung der Ca^{++}-Konzentration.

Das Verhalten des Aktomyosins ändert sich bei Reduktion der Mg.ATP-Konzentration auf 0.1 - 10 uM (Abb. 13). Hält man ATP auf 2×10^{-6} M konstant und variiert die Mg^{++}-Konzentration, so erhält man eine stark ausgeprägte Clearing-Phase besonders dann, wenn die Mg^{++}-Konzentration höher als die ATP-Konzentration ist. Bei Äquivalenz von Mg^{++} und ATP ist Trübungsverminderung bereits etwas geringer und nimmt bei weiterer Verringerung der Mg^{++}-Konzentration solange ab, bis bei einer Relation von ATP:Mg^{++} = 10:1 fast keine Clearing- Reaktion mehr auftritt.
Gleichzeitig wird der 1. Trübungsanstieg bis zum Plateau steiler: bei Änderung der Mg^{++}-Konzentration von 6×10^{-6} auf 6×10^{-7} ist die Geschwindigkeit des 1. Trübungsanstiegs um den Faktor 30-50 erhöht. Die Plateauphase wird dabei erheblich verkürzt: Bei Verminderung der Mg^{++}Konzentration von 6×10^{-6} auf 2×10^{-6} wird die Plateaudauer auf 1/4 reduziert. Bei weiterer Erniedrigung der Mg^{++}-Konzentration geht die Reaktion fast unmittelbar bis zur endgültigen Maximaltrübung, ohne ein Plateau auszubilden.

Die Geschwindigkeit des 2. Trübungsanstieges ist für 6×10^{-6}M und 2×10^{-6}M Mg^{++} nahezu gleich. Die maximale Endtrübung wird nur bei Äquivalenz von ATP und Mg^{++} erreicht; unter allen anderen Bedingungen liegt sie geringfügig niedriger.

In einigen wenigen Experimenten wurde auch die ATP-Konzentration bei konstantem Mg^{++} variiert. Insbesondere führt eine Erhöhung der ATP-Konzentration auf das 3-fache der Mg-Konzentration zu einer erheblichen Verkürzung der clearing-Phase und einer Beschleunigung der 1. Trübungsphase auf das 5fache. Ein Plateau ist nicht mehr erkennbar. Es folgt unmittelbar ein langsamerer 2. Trübungsanstieg bis zum Erreichen der Maximaltrübung, die höher ist als bei Äquivalenz von Mg^{++} und ATP(Abb.12 B).

3.7 Einfluß der Proteinkonzentration auf die Superpräzipitationskinetik. Ultraschall.

Die Äquivalenz von Mg^{++} und ATP in einer Endkonzentration von 2×10^{-6}M führt im allgemeinen zu einer brauchbaren Darstellung aller Phasen der Superpräzipitation, wobei zwischen Ca^{++}_{fr}-Konzentrationen von 10^{-5}M und 10^{-8}M die Ca^{++}-Sensitivität der Präparationen getestet werden kann. Diese Standardwerte sind etwas abhängig von der Proteinkonzentration. Sowohl Ca^{++} als auch Mg^{++} werden während der Reaktion an Protein gebunden und stehen zusätzlich mit ihren Komplexen an energiereiche Phosphate und deren Hydrolyseprodukten im Gleichgewicht. Während die Ca^{++}-Reserve mittels Ca.EGTA-Puffern sehr hoch gehalten werden kann, ist die verfügbare Mg^{++}-Menge in diesem System relativ gering. So ist eine geringere als die eingesetzte Mg^{++}-Konzentration frei verfügbar.Es gab im Rahmen dieser Arbeit leider keine Möglichkeit, die aktuellen Konzentrationen der bivalenten Kationen im relevanten Konzentrationsbereich direkt zu bestimmen und so ihre Proteinbindung zu erfassen.

Wir haben immer bei Proteinkonzentrationen zwischen 0.1 und 0.2 mg/ml gearbeitet. Erhöht man die Proteinkonzentration wesentlich über 0.2 mg/ml, so kommt es bereits zu Beginn des 2. Trübungsanstiegs zur Bildung makroskopisch sichtbarer Aktomyosinaggregate, deren Bildung nur durch Ultrabeschallung begrenzt werden kann (sh. THEILE(22)). Dauernde Ultrabeschallung bei niedrigen Intensitäten führt zu einer erheblichen Verlängerung der Clearing-Phase,zu einer Verringerung der Plateauhöhe und zu einer Verbreiterung des Plateaus, zu einer Beschleunigung des 2. Trübungsanstiegs und zu einer erheblichen Vergrößerung von ΔE_{max}, bedingt durch Verringerung der Aggregatbildung.Bei der geringen Eichfähigkeit des von uns benutzten Ultraschallgeräts (BRAUNSONIC, Braun-Melsungen) war es bisher nicht möglich, die Superpräzipitationskinetik unter Ultraschall in allen kinetischen Phasen reproduzierbar zu bestimmen. Nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 50 µg/ml) ist das relative ΔE_{max} ungefähr gleich den unter Ultraschall zu erhaltenen Maximalhöhen. Hier ist die Meßempfindlichkeit aber sehr gering und die Gesamtkinetik kaum auswertbar.
Auch das Homogenisierverfahren bei der Aktomyosinextraktion aus Myofibrillen sowie die ATP-Konzentration bei der Extraktion haben einen Einfluß auf die Kinetik der Superpräzipitation (s.S.19).

3.8 Standardverfahren zur Darstellung der Superpräzipitationskinetik an Schweineherz-Aktomyosin.

Aufgrund der geschilderten Ergebnisse erschien es sinnvoll, für alle weiteren Untersuchungen die Reaktionsbedingungen zu standardisieren.

Tabelle 1 - 3 zeigen die Standardisierung für die Präparation und Vorbehandlung von Myofibrillen und Aktomyosin. Das dialysierte Material in Lösung D (Tab. 3) soll 0.6 - 1.2 mg Protein

pro ml enthalten. Das Präparat ist längstens nach 3 Tagen zu verwerfen.
Vor den Messungen werden 10 ml des Aktomyosinpräparats unter Eiskühlung mit 50 ml eiskaltem dest. Wasser am Potter-Elvehjem-Homogenisator mit einer Schergeschwindigkeit von maximal 1000 cm/min für 1 min homogenisiert. Das Homogenat wird unter Eis fortlaufend gerührt.

2.5 ml der Aktomyosinsuspension in die bei 32°C vortemperierte Meßküvette pipettiert, wobei für den weiteren Versuchsablauf das Zeitschema der Tabelle 5 gilt. Damit enthält der Versuchsansatz bei Reaktionsbeginn:

Tabelle 6

0.1-0.2 mg Protein
0.1 M KCl
8.3 mM Imidazol.HCl pH 7.4
10^{-5}- 10^{-8}M Ca^{++}_{fr} als Ca.EGTA-Puffer
2 x 10^{-6} M Mg.ATP

pH zu Beginn der Reaktion 7.4
Vorwärmzeit : 4 min
Temperatur : 32°C

4. Haben ß-Adrenergica und ß-Rezeptoren-Blocker einen direkten Einfluß auf die kontraktilen Proteine der Herzmuskelzelle ?

HONIG u. REDDY(12) und HONIG(11) haben Versuche publiziert, in denen sie mit sehr hohen Konzentrationen von Noradrenalin-analogen und ß-Adrenoceptor-Blockern die ATPase-Aktivität von Herzmuskel-Aktomyosin und das Superpräzipitationsverhalten von Herzmuskel-Aktomyosin beeinflussen konnten. Zusammengefaßt finden diese Autoren, daß ß-Rezeptorenblocker und partielle ß-Agonisten die Aktomyosin-ATPase hemmen und bei Mg^{++}-Überschuß die Clearing-Phase stark verlängern. Diese Effekte können durch Adrenalin revertiert werden. Alle Konzentrationen an ß-Agonisten und ß-Blockern liegen über 10^{-6}M. Das Testsystem für die Superpräzipitation enthält 0.5 - 1 mM ATP und 0.5-2 mM Mg^{++}. Ca^{++} in Ca.EGTA-Puffern revertiert ebenfalls die Effekte der ß-Blocker und wird demzufolge (als Verunreinigung des verwendeten ATP) im Versuchsansatz niedriger als 10^{-6}M gehalten. Das Superpräzipitationssystem zeigt nur die Clearing-Phase und den 2. Trübungsanstieg, was unter diesen speziellen Testbedingungen auch jederzeit bestätigt werden kann.

Desensitierung, d.h. selektive Extraktion des Tropomyosin-Troponin-Komplexes aus natürlichem Aktomyosin, führt nach HONIG u. REDDY(12) zur Unempfindlichkeit des Aktomyosins gegenüber ß-Blockern. Die Autoren schließen daraus, daß der Angriffspunkt an einem der Einzelproteine des Komplexes liege, jedoch nicht am Troponin C selbst, da sie einen nicht kompetitiven Typ der Hemmung finden.

Wir haben zunächst erfolglos versucht, diese Effekte unter den von HONIG u. REDDY(12) angegebenen Testbedingungen zu reproduzieren. Wir haben dann weiter versucht, in unserem Standardsyster Bedingungen zu finden, unter denen (-)-Iso-

proterenol und die ß-Blocker (-)-Bupranolol und (-)-Propranolol bei pharmakologisch relevanten Konzentrationen die Superpräzipitation beeinflussen. In der Tat haben wir in einem von 3 geprüften Aktomyosinpräparaten Effekte gefunden, die sich aber nur in diesem Präparat darstellen ließen.

4.1 (-)-Isoproterenol

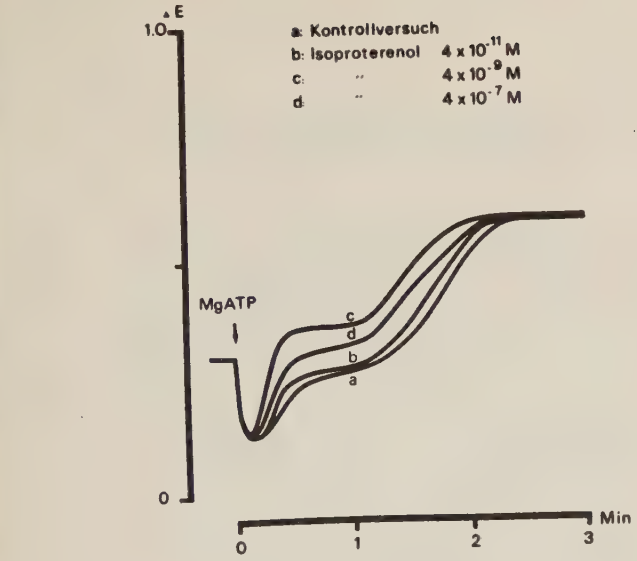
Während der Vorwärmperiode wurde dem Bestimmungsanssatz in der 2. Minute 10 µl (-)-Isoproterenol-Stammlösungen zugesetzt, die zu Endkonzentrationen zwischen 4×10^{-5}M und 4×10^{-13}M führten. Dieser Zusatz führt - optimal bei einer Konzentration von 4×10^{-9}M - zu einer Verminderung der Halbwertszeit der Superpräzipitation auf 45 % des Kontrollwertes (Abb. 13 B). Abb. 13 A zeigt, daß hierbei die Zeitdauer der Clearing-Phase stark vermindert und der 1. Trübungsanstieg doppelt so schnell wie in der Kontrolle verläuft und die Plateauhöhe auf das Doppelte angehoben wird. Bei höheren Konzentrationen verschwindet dieser Effekt wieder, insbesondere bei solchen Konzentrationen, bei denen HONIG u. REDDY(12) einen entsprechenden Effekt für Adrenalin als ß-Agonisten nachgewiesen hatten (10^{-6}-10^{-5}M). Dies gilt insbesondere für die in Abb. 13 dargestellten Versuche, in denen Ca^{++}_{fr} auf 10^{-6} M begrenzt wurde, da hohe Ca^{++}-Konzentrationen diese Effekte ja überlagern sollen oder sogar antagonistisch wirken sollen.

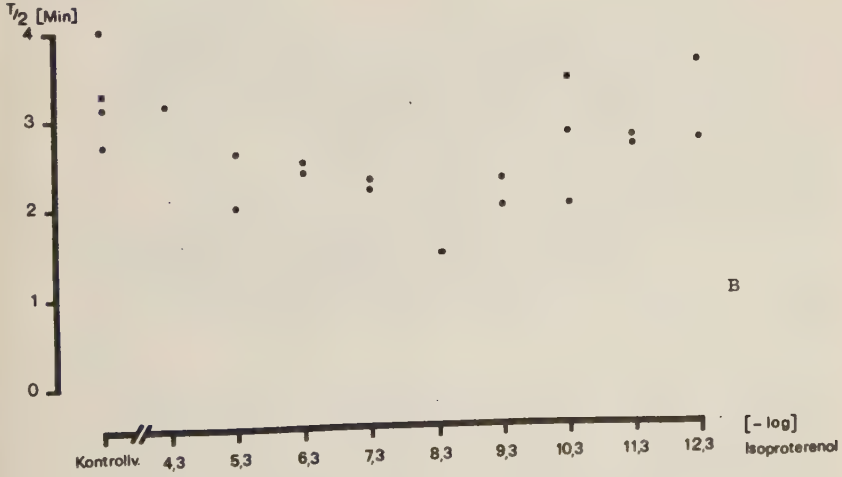
Abbildung 13 (A,B)

Einfluß von (-)-Isoproterenol auf die Superpräzipitationskinetik unter Standardbedingungen.
Ca^{++} 10^{-6}M
Mg.ATP 2×10^{-6}M

Im Abbildungsteil B entspricht jeder Punkt einem Einzelversuch.

Abbildung 13





Alle geprüften Aktomyosinpräparate waren Ca^{++}-sensitiv; dennoch konnte nur an einem von drei Präparationen eine Sensitivität für (-)-Isoproterenol beobachtet werden.

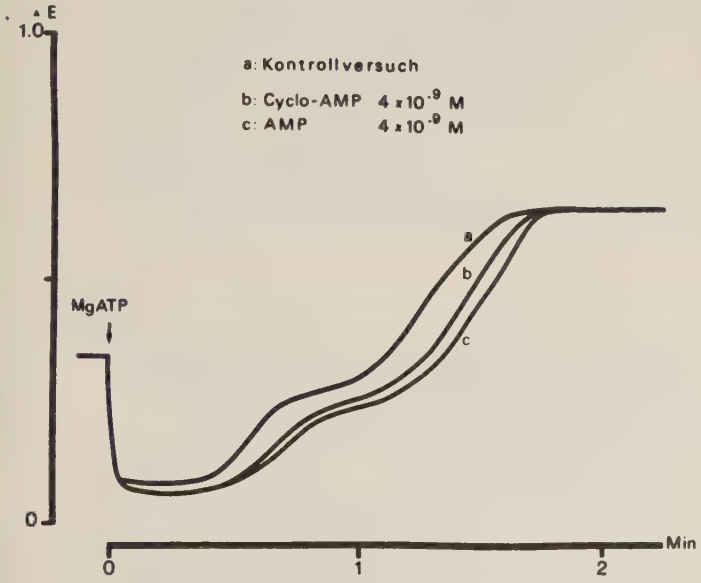
Der Effekt von (-)-Isoproterenol kann verstärkt werden, wenn die Substanz zuerst in die Meßküvette pipettiert wird und dann das eiskalte Aktomyosin eingemischt wird. Hierdurch ist das Aktomyosin während der gesamten Vorwärmperiode in Kontakt mit dem Pharmakon. Andererseits ergibt sich fast kein Effekt, wenn die Substanz erst während der Clearing-Phase dem Reaktionsgemisch zugesetzt wird. Bei höheren Ca^{++}_{fr}-Konzentrationen (10^{-5}M) wird der Effekt überspielt durch den bereits sehr schnellen Trübungsanstieg und die Reduktion der Clearing-Phase. Eine Veränderung von ΔE_{max} unter (-)-Isoproterenol konnten wir nur in einem Experiment finden, daß sich als nicht reproduzierbar erwies(vgl. hierzu auch Abb. 12).

4.2 3'5'-cycloAMP und 3'-AMP

Es wird vielfach angenommen, daß eine cycloAMP-abhängige Proteinphosphorylierung zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit des Tropomyosin-Troponin-Komplexes und damit zu einer erhöhten Ca^{++}-Sensitivität des kontraktilen Apparats führt (s. z.B. WEBER(31). PERRY(21)). Es wäre nun möglich, daß die eine Aktomyosinpräparation, die auf (-)-Isoproterenol reagierte, eine geringe Verunreinigung durch Fragmente der Muskelmembran oder des sarkoplasmatischen Retikulums Adenylatcyclase enthalten haben könnte, die über die Bildung von cyclo-AMP die beobachteten Effekte verursachte.

Es wurde daher in einigen orientierenden Experimenten der Einfluß von cyclo-AMP und seinem Abbauprodukt, AMP, auf die Superpräzipitationskinetik untersucht. Hierbei ergibt sich aber gerade eine Umkehrung des Isoproterenol-Effekts. Cyclo-AMP und AMP erhöhen geringfügig den Clearing-Effekt und verlängern die Clearing-Phase. Trübungsanstiege und

Abbildung 14



Einfluß von 3'5'-cyclo-AMP und 5'-AMP auf die Superpräzipitationskinetik

Ca^{++} 10^{-6}M

Mg.ATP 2×10^{-6}M

und Plateauphase entsprechen der Kontrolle. ΔE_{max} ist ebenfalls mit dem Kontrollwert identisch.

Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß sie etwa den intrazellulären Werten für cAMP nach Stimulation mit 10^{-8}-10^{-9}M (-)-Isoproterenol entsprechen, ohne dabei eine mögliche Kompartimentierung von Cyclo-AMP zu berücksichtigen. Die geringen hier beobachteten Effekte sind in keinem Fall eine Erklärung für den beobachteten Effekt von (-)-Isoproterenol. Sie ließen sich qualitativ gleichartig auch bei einer späteren Aktomyosinpräparation reproduzieren, die nicht auf (-)-Isoproterenol reagierte.

4.3 Einfluß der ß-Blocker (-)-Bupranolol und (-)-Propranolol

Erstaunlicherweise und im Gegensatz zu den Befunden von HONIG u. REDDY(12) hatten weiterhin (-)-Bupranolol und (-)-Propranolol qualitativ den gleichen Effekt auf die sensitive Aktomyosin-Präparation wie (-)-Isoproterenol. Besonders ausgeprägt war die Reaktion auf (-)-Bupranolol bei 4×10^{-10}-4×10^{-9}M. Hier kam es bei einer Verkürzung der Clearing-Phase zu einer 3fachen Erhöhung der Geschwindigkeit des 1. Trübungsanstiegs mit "overshoot"-Phänomenen. Ebenso liegt die Plateauhöhe weit über der Kontrolle, und auch hier ist kein Einfluß auf den 2. Trübungsanstieg und auf die Lage von ΔE_{max} sicher reproduzierbar. (Abb. 15A). Ein ähnliches Verhalten zeigt sich mit (-)-Propranolol(Abb. 15B).

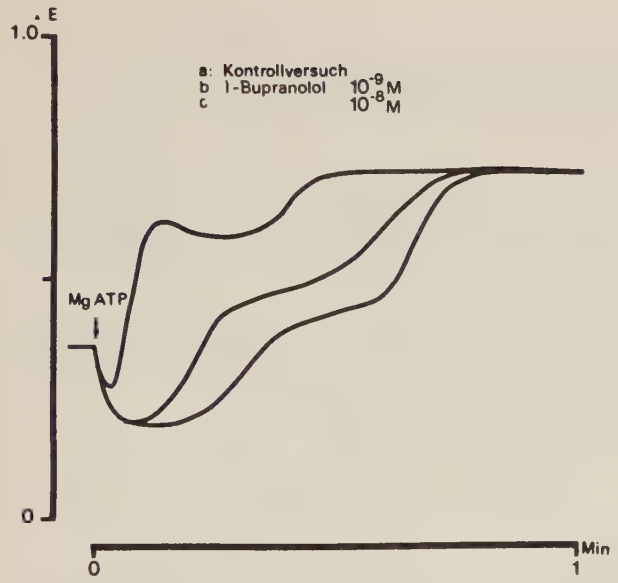
Abbildung 15

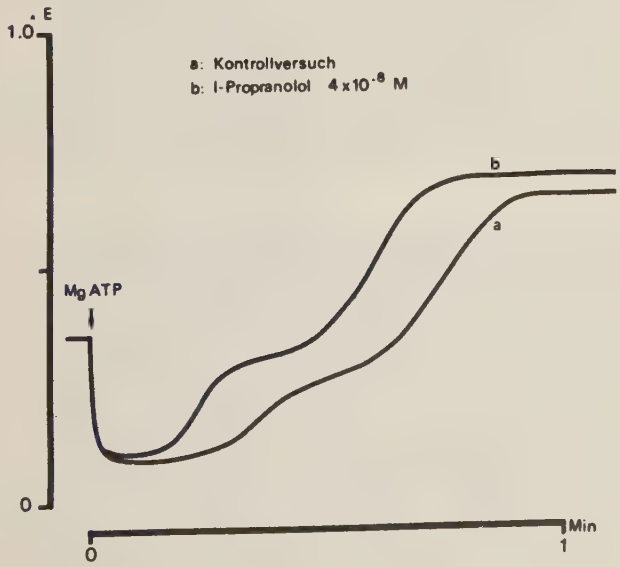
Einfluß der ß-Blocker (-)-Bupranolol (A) und (-)-Propranolol (B) auf die Superpräzipitationskinetik eines Aktomyosinpräparates.

Ca^{++} 10^{-6}M

Mg.ATP 2×10^{-6}M

Abbildung 15





4.4 Welchen Prozess der Superpräzipitationskinetik beeinflussen die ß-Adrenergica ?

Wenn tatsächlich ß-Adrenergica, und zwar sowohl ß-Agonisten wie ß-Blocker, gleichsinnige Effekte auf die kontraktilen Proteine haben sollten, so ist zu fragen, welchen Prozess sie in den geschilderten in-vitro-Experimenten beeinflußt haben sollten.

Es muß sich um einen Prozess handeln, der ohne Beteiligung von ATP und Mg^{++} in der Vorwärmphase der Reaktion abläuft und wesentlich den ersten Trübungsanstieg und die Lage der Plateauphase beeinflußt. Andererseits ist dieser Prozess nicht mehr beeinflussbar, wenn die Pharmaka während der Clearing-Phase zugesetzt werden. Die beobachteten Änderungen des Superpräzipitationsverhaltens sind außerordentlich ähnlich denen, die bei einer Verlängerung der Vorwärmdauer an den Aktomyosinpräparationen reproduzierbar auftreten (s.Abb.7). Wir haben uns deshalb gefragt, ob diese Effekte dann reproduzierbar auftreten, wenn an einer Aktomyosinpräparation die Verkürzung der Clearing-Phase durch Verlängerung der Vorwärmperiode besonders deutlich sichtbar sind, oder die Vorwärmeffekte durch Zusatz der ß-Adrenergica verstärkt werden. Beide Annahmen sind vorläufig nicht zu realisieren gewesen.

Die Vergleichsversuche mit Cyclo-AMP und AMP schließen praktisch aus, daß die ß-Adrenergica durch Vermittlung der Adenylatcyclase auf die kontraktilen Strukturen einen Einfluß ausgeübt haben können. Das wird ebenso unwahrscheinlich durch die gleichsinnige Wirkung von ß-Agonist und ß-Blockern. Es muß sich also um einen Direkteinfluß auf die kontraktile Struktur handeln. Dabei bleibt völlig offen, ob es sich um einen Einfluß auf den Tropomyosin-Troponin-Komplex handelt, wie HONIG u.REDDY(12) annehmen; denn bei der "Desensitierung" von Aktomyosin werden eine große Zahl weiterer Proteine aus dem Aktomyosinsystem ex-

trahiert, die mit Sicherheit den Verlauf der Superpräzipitationskinetik beeinflussen (vgl. Briskey et al.(3), Seraydarian et al.(26)) und ebenso potentielle Akzeptoren für die Pharmaka darstellen könnten.

Solange diese Versuche nicht reproduzierbar gestaltet werden können, bleibt zwar die Tatsache bestehen, daß unter in-vitro-Bedingungen ß-Adrenergica das Verhalten der kontraktilen Proteine u.U. beeinflussen können. Ein direkter Einfluß auf diese Strukturen in-vivo bleibt weiterhin fraglich.

5. Einfluß von Ca^{++}-Antagonisten auf die Superpräzipitationskinetik.

5.1 (-)-Verapamil

BLEEKER (1) hat behauptet, daß der Ca^{++}-Antagonist (-)-Verapamil bei einer Konzentration von 10^{-7}M stereospezifisch die Superpräzipitation von Herz-Aktomyosin des Meerschweinchens beeinflußt.

Wie bereits geschildert, ist das von der Autorin verwandte Aktomyosin außerordentlich instabil (s.hierzu Abb.5), soweit wir nach dem gleichen Präparationsverfahren aus dem Schweineherzen den Präparationsgang nachvollziehen konnten. Es gelang uns aber nicht, aus Meerschweinchenmyocard reaktive Präparate nach diesem Verfahren zu erhalten.

Das Superpräzipitationsverhalten wurde bei 22°C getestet und zeigt somit nur die Clearing-Phase und den 2. Trübungsanstieg auf ΔE_{max} (vgl. unsere Abb.8). Sie arbeitet weiter bei der sehr hohen Proteinkonzentration von 1.1 mg/ml, die wir

wegen der schnellen Bildung großer Proteinaggregate vermeiden. Weiter enthält der Reaktionsansatz die sehr hohe Konzentration von 1 mM Mg^{++} gegenüber 2 x 10^{-5}M ATP und in einigen Versuchen einen Zusatz von 5 x 10^{-5}M Ca^{++} ohne Ca^{++}-Pufferung. Weiter arbeitet sie bei pH 6.8 in Tris-Maleat-Puffer, also rund 0.5 pH-Einheiten unterhalb des hier beschriebenen pH-Optimums. Wir haben auch unter diesen Bedingungen versucht, sowohl die Superpräzipitation von Schweineherz-Aktomyosin als auch von Meerschweinchen-Aktomyosin zu messen und erhielten außerordentlich lange Clearing-Phasen und keine reproduzierbaren Darstellungen der weiteren Phasen der Superpräzipitation.

BLEEKER (1) findet nun,daß sowohl das racemische Verapamil (2.4 x 10^{-6}M) als auch die Enantiomeren (je 3 x 10^{-7}M) die Clearing-Phase verlängern, wobei (-) Verapammil etwas wirksamer sein soll als (+)-Verapamil, die Enantiomeren aber beide wesentlich wirksamer als das Racemat. Die Beschleunigung der Superpräzipitation durch 5 x 10^{-5}M Ca^{++} wird durch Zusatz der genannten Konzentrationen von Verapamil teilweise rückgängig gemacht, wobei hier das Racemat wirksamer als die Enantiomeren sein soll.

Wir haben sowohl unter den von der Autorin genannten Meßbedingung als auch unter systematischer Variation unseres Standardsystems irgendeine Bedingung zu finden versucht, unter der die Ergebnisse von BLEEKER reproduziert werden könnten. Wie die folgende Tabelle zeigt , ist dies in keinem Falle gelungen. Während die Halbwertszeiten der Superpräzipitation unter allen geprüften Konzentrationen von (-) - Verapamil überhaupt keine Änderung erfahren, sind die geringen Änderungen von ΔE_{max} weder innerhalb der einzelnen Versuche noch zwischen den 4 geprüften Aktomyosinpräparationen, die in die Versuche einbezogen wurden, in irgendeiner Weise reproduzierbar.

Tabelle 7

Verhältnis von ΔE_{max} unter (-)-Verapamil zum Kontrollexperiment. Erklärung im Text.

-log Ca^{++}_{fr}	-log Mg^{++}	ATP	(-)-Verapamil 4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
5.0	4.7	4.7		±27%				±29%
	5.7	4.7		+ 2%			0	+ 3%
	5.7	5.3		+ 9%				
	5.7	5.1						+ 5%
	6.2	4.7	+ 3%	- 4%	- 1%	+ 4%	- 3%	- 8%
	6.2	5.2	+ 4%	- 4%				- 4%
	6.2	5.7	+ 4%	- 7%				+ 3%
	6.7	4.7			± 7%			+ 3%
	6.7	5.0						- 8%
	6.7	6.0						- 3%
	6.7	6.7						- 4%
	7.2	4.7		- 1%	0	- 3%	+ 7%	- 2%
	5.7	4.7			0		0	
6.0	6.2	4.7	+ 4%	+ 7%	- 6%			
	6.2	5.2	+ 3%					
	6.2	5.7	+10%					
	7.2	4.7	- 5%					
7.0	5.7	5.0						0
	6.2	5.2	+ 4%					
	6.2	5.7	+18%					
	7.2	4.7	0					
	7.7	4.7			±11%			
	7.7	5.0			- 3%			
8.0	7.2	4.7	+ 3%					

5.2 Nifedipine

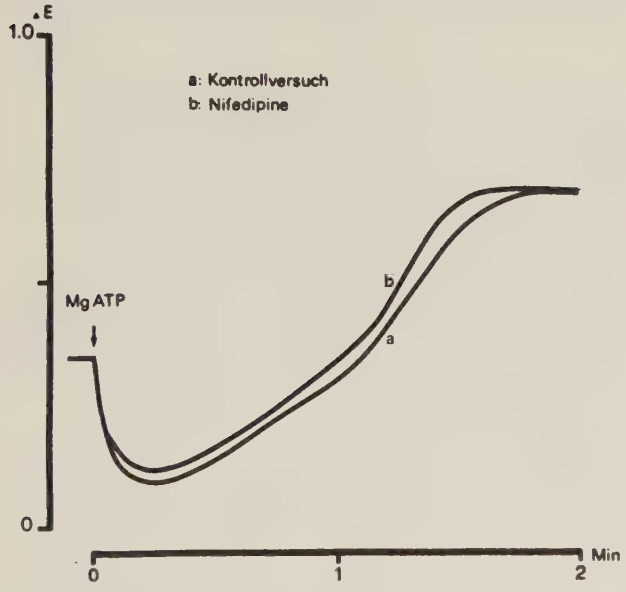
Mit einem anderen Ca^{++}-Antagonisten, Nifedipine, wurde ebenfalls geprüft, ob sich ein direkter Einfluß auf die Superpräzipitation von Aktomyosin nachweisen lasse. Wie Abb. 16 und Tabelle 8 eindeutig zeigen, hat auch dieser Ca^{++}-Antagonist keinerlei Einfluß auf die Superpräzipitationskinetik.

Tabelle 8

Superpräzipitation von Schweineherz-Aktomyosin in Gegenwart von Nifedipine (2.3×10^{-5}M)
Mg.ATP 2×10^{-6}M

Ca^{++}_{fr} M	Kontrolle E_{max}	/2(min)	Nifedipine E_{max}	/2(min)
10^{-5}	0.310	2.2	0.300	1.7
	0.300	2.4	0.300	2.2
	0.300	2.2		
10^{-6}	0.225	5.4	0.230	5.3
	0.225	5.2	0.230	5.2
	0.161	3.5		
10^{-7}	0.195	7.2	0.200	4.9
	0.180	4.2	0.115	4.1
	0.160	5.2	0.140	4.9

Abbildung 16



Superpräzipitationskinetik in Gegenwart des Ca^{++}-Antagonisten Nifedipine (2.3×10^{-6} M).

Ca^{++} 10^{-5} M

Mg.ATP 2×10^{-6} M

Abschließende Bemerkungen

Die Untersuchung der Superpräzipitationskinetik kann als eine eingeführte Methode zur Charakterisierung der Ca^{++}-Sensitivität von Aktomyosinpräparationen gelten. Hierfür wurde das Verfahren von EBASHI(5) eingeführt und in der Folge von einer großen Zahl von Laboratorien benutzt und immer wieder modifiziert. Als Meßparameter führte EBASHI die Halbwertszeit der Superpräzipitation $\tau/2$ und die Maximaltrübung ΔE_{max} ein. Wie sich besonders bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Superpräzipitation (s. Abb.8) gezeigt hat, sind dies jedoch reine Hilfsgrößen, die über den Verlauf der einzelnen Phasen der Superpräzipitationskinetik nichts aussagen. Besonders die Formierung grober Partikelaggregate und ihre Abhängigkeit von der Proteinkonzentration führt zu einem schwer vorausbestimmbaren Wert von ΔE_{max} und damit zu einer beliebigen Lage von $\tau/2$. Wenn wir diese eingeführten Größen hier dennoch vielfach benutzt haben, dann aus Mangel an einem kinetischen Modell, das die Reaktionskonstanten und die Reaktionsordnung der Einzelphasen der Superpräzipitation enthält und erlaubt, den Verlauf der Trübungsentwicklung zu simulieren. Bis ein derartiges Modell zur Verfügung steht, kann lediglich semiquantitativ die relative Zeitdauer der einzelnen kinetischen Phasen und der dabei erreichte Trübungsgrad beschrieben werden (vgl. z.B. PUSZKIN et al. (23)).

Für die Anwendbarkeit und Vergleichbarkeit dieser Methodik ist besonders störend, daß nahezu jedes Laboratorium andere Präparationsbedingungen für Aktomyosin und andere Ionenbedingungen und Temperaturbedingungen zur Bestimmung der Superpräzipitationskinetik benutzt. Beispiele wurden S. 43 und S. 51 gegeben. Wie ebenfalls bereits diskutiert, führen die in der Literatur angegebenen Präparationsmethoden in unseren Händen oft zu instabilen oder inaktiven Präparaten. Über die Stabilität von Aktomyosinpräparaten

gibt es fast keine Angaben in der benutzten Literatur. Für die Relevanz einer solchen Untersuchung ist aber unbedingt zu fordern, daß Angaben über die Stabilität der Aktomyosinpräparationen vorliegen, wie hier geschehen (s. Abb.6).

Auch wenn hier eine Standardisierung möglich wäre, würde es schwer halten, über die Meßbedingungen für die Superpräzipitationskinetik einen generellen Consens zu erzielen, solange die Diskussion über die Frage nach der lokalen Verteilung von Ionen und der aktuellen Ionenkonzentrationen im myofibrillären Raum während des Kontraktionszyklus andauert. Allgemein anerkannt ist wohl, daß die Konzentration freier Ca^{++}-Ionen über einen Bereich von 10^{-5}M bis 10^{-8}M variiert werden muß, um die Ca^{++}-Sensitivität zu prüfen (EBASHI (5), WEBER u. WINICUR (31)). Dagegen herrscht über die Einstellung der Mg^{++}- und ATP-Konzentrationen und ihrer gegenseitigen Relation keinerlei Einigkeit: die Literaturangaben überstreichen für die Konzentrationen einen Bereich von 3, für die Relationen einen Bereich von 4 Zehnerpotenzen.

Während die Angaben über den Reaktions-pH zwischen pH 6.8 und 7.6 liegen, sind die Ansichten über die notwendige Reaktionstemperatur geteilt. Die methodischen Angaben streuen zwischen 20°C und 37°C, obwohl leicht zu zeigen ist, daß nur in einem ganz engen Temperaturbereich (s. Abb.8) überhaupt alle Phasen der Superpräzipitation erfasst werden können. Keinerlei Angaben bestehen über die Vorwärmdauer vor Start der Reaktion, die nach den hier vorgelegten Ergebnissen einen erheblichen Einfluß auf die Kinetik der gesamten Reaktion hat.

Insofern war es nützlich und wünschenswert, diese Parameter genauer zu untersuchen. Sie haben zu einer strengeren Standardisierung unserer Methodik geführt, als dies der benutzten Literatur zu entnehmen war.

Vorallem ist ein definierter Zeitplan für jedes Superpräzipitationsexperiment zu fordern und anzugeben, wie hier geschehen.

Hält man die erarbeiteten sehr definierten Bedingungen ein, so ist es weder möglich, die von HONIG u. REDDY (12) und HONIG(11) gezeigten Einflüsse von ß-Adrenergica auf die Superpräzipitationskinetik zu reproduzieren noch die Daten von BLEEKER (1) über den Einfluß von Verapamil auf superpräzipitierendes Aktomyosin zu bestätigen.Gerade die letztgenannten Untersuchunegn wurden auch unter Abwandlung unseres Standardsystems bei einer Vielzehl verschiedener Bedingungen durchgeführt, ohne daß irgendein Ansatz gefunden werden konnte, der diese Befunde bestätigt. Man kann nur vermuten, daß hier ein zuwenig standardisierter Zeitplan für den Reaktionsablauf zu systematischen Fehlschlüssen geführt hat. Besonders gut läßt sich die Möglichkeit für derartige Fehlschlüsse an der Tabelle 8 dieser Arbeit demonstrieren:
Zwischen jeden einzelnen Versuch in der Reihe zur Prüfung von Nifedipine wurde ein entsprechender Kontrollversuch eingeschoben, um Veränderungen des Aktomyosin nach dem Homogenisieren in Eis verfolgen zu können. Zusammengehörige Paare von Experimenten sind einander gegenübergestellt und zeigen dann ganz eindeutig, daß die beobachteten Veränderungen im Aktomyosin selbst ablaufen, nicht aber dem Einfluß des Pharmakons zuzuschreiben sind. In gleicher Weise sind alle in den Abbildungen gezeigten Kurvenbilder gewonnen worden.

Abgesehen von einigen bisher nicht reproduzierbaren Befunden mit ß-adrenergen Wirkstoffen müssen wir vorläufig schließen, daß ein direkter Einfluß der Ca^{++}-Antagonisten (-)-Verapamil und Nifedipine auf die Proteine des kontraktilen Systems nicht besteht.

Literatur

1 Bleeker, A.(1977): The mechanism of the cardiodepressive action of ± Verapamil (Isoptin^{R}). Dissertation Amsterdam. 111 S.

2 Bode, H.J., Moser, J.G.(1974): Influence of Mg^{++} and ATP on superprecipitation of insect desensitized actomyosin. Comp. Biochem. Physiol. 50B,

3 Briskey,E.J., Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M.(1967): The modification of actomyosin by -actinin. II. The effect of ∝ -actinin upon contractility Biochim.Biophys.Acta 133, 412-423

4 Briskey, E.J., Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M.(1967): The modification of actomyosin by ∝ -actinin. III. The interaction between ∝ -actinin and actin. Biochim.Biophys.Acta 133, 424-434

5 Ebashi, S., Ebashi, F.(1964): A new protein component participating in the superprecipitation of myosin B. J. Biochem. 55, 604-613

6 Ebashi, S., Masaki, T., Tsukui, R.(1974): Cardiac contractile proteins. Adv. Cardiol. 12, 59-69

7 Ebashi, S, Nonomura, Y.(1973): Proteins of the myofibril. In: The structure and function of muscle (G.H.Bourne ed) Vol.III, p. 285-362. New York, London:Academic Press.

8 Fischer, A.(1973): Isolierung und Superpräzipitation von Aktomyosin aus dem Kalbsherzen. Examensarbeit. Freiburg 92 S.

9 Green, J., Mommaerts, W.F.H.M.(1953): Adenosintriphosphatase systems of muscle. I. An electrotitrimetric method of measurement. J. Biol. Chem. 202, 541-549

10 Hasselbach, W.(1957): Die bindung von Adenosindiphosphat, von anorganischem Phosphat und von Erdalkalien an die Strukturproteine des Muskels. Biochim.Biophys.Acta 25, 562-574

11 Honig, C.R.(1968): Depression of myosin B by catecholamine analogs: mechanism and in vivo significance. Amer.J.Physiol. 214, 357-364

12 Honig, C.R., Reddy, Y.S.(1973): Effect of catecholamine analogs on control of actomyosin by native tropomyosin and calcium: the nature of the negative inotropic receptor. J.Pharmacol. Exp. Therapeutics 184, 330-338

13 Kaufmann, R., Bayer,R., Fürniss, T., Krause, H., Tritthart, H.(1974): Calcium-movement controlling cardiac contractility. II. Analog computation of cardiac excitation-contraction coupling on the basis of calcium kinetics in a multicompartment model. J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 543-559

14 Kominz, D.R.(1970): Studies of adenosine triphosphatase activity and turbidity in myofibril and actomyosin suspensions. Biochemistry 9, 1793-1801

15 Lecocq, J., Inesi, G.(1966): Determination of inorganic phosphate in the presence of adenosine triphosphate by the molybdo-vanadate method. Anal. Biochem. 15, 160-163

16 Lin, T., Morales, M.F.(1977): Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: the actomyosin ATPase system. Anal. Biochem. 77, 10-17

17 Maruyama, K., Watanabe, S.(1962):The role of magnesium in the superprecipitation of myosin B. J.Biol.Chem. 237, 3437-3442

18 Moser,J.G., Theile, R., Krüger, G.(1974): Superprecipitation of actomyosin in the presence of specific antibodies. Europ. J. Physiol. 347 Suppl. R 17

19 Natori, R., Isojima, C., Natori, R.(1976): On various types of periodic contractions in skinned fibers of skeletal muscle. Tokyo Med. J. 23, 255-269

20 Ohtsuka, M., Ebashi, F., Imai, S.(1964): Cardiac myosin B and Calcium ions. J. Biochem.55, 192-193

21 Perry, S.V., Cole, H.A., Frearson, N., Moir, A.J.G., Morgan, M., Pires, E.(1975): Phosphorylation and the regulation of the function of myosin and the troponin complex. Mosbacher Coll. Ges. Physiol.Chem. 26, 107-121

22 Portzehl,H., Caldwell, P.C., Rüegg, J.C.(1964): The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab maja squinado on the internal concentration of free calcium ions. Biochim.Biophys.Acta 79, 581-591

23 Puszkin,S.,Puszkin,E., Katz.A.M., Aledort, L.M.(1974): Control of platelet actomyosin activity: Effect of ADP on superprecipitation and ATPase activity of human platelet actomyosin. Biochim.biophys.Acta 347, 102-112

24 Rüegg, J.C.(1971): Experiments on glycerinated muscle fibres. Expts. in Physiol.a.Biochem. 4, 203-217

25 Schwarzenbach, G., Flaschka, H.(1965): Die komplexometrische Titration. Die Chemische Analyse, Bd. 45. Stuttgart: F. Ehmke.

26 Seraydarian,K., Briskey,E.J.,Mommaerts,W.F.H.M.(1967): The modification of actomyosin by α-actinin. I. A survey of experimental conditions. Biochim.Biophys.Acta 133, 399-411

27 Szabó,J., Nosztray,K., Szöör,Å.(1978): Studies on the superprecipitation of actomyosin in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. Acta Biochim.Biophys. Acad.Sci.Hung. 13, 91-98

28 Szent-Györgyi, A.(1951): Chemistry of muscular contraction. 2nd edition. New York: Academic Press.

29 Theile, R.F.(1974): Funktionsanalyse des natürlichen Actomyosinsystems unter Einfluß von Antikörpern. Diplomarbeit. Freiburg.

30 Weber, A.(1956): The ultracentrifugal separation of L-Myosin and actin in an actomyosin sol under the influence of ATP. Biochim.Biophys.Acta 19, 346-351

31 Weber,A., Winicur, S.(1961): The role of calcium in the superprecipitation of actomyosin. J.Biol. Chemistry 236, 3198-3202

Lebenslauf

31.12.1943	als 4. Tochter des Dipl.Ing. Walter Knyrim und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Feuerstein in Bensberg/Köln geboren.
1950-1954	Volksschule in Wuppertal
1954-1960	Realschule in Wuppertal
1960-1963	Buchhändlerlehre bei der Firma Burchardt in Wuppertal. Abschluß mit der Gesellenprüfung.
1963-1965	Ausbildung zur Staatl. gepr. Gymnastiklehrerin an der Berufsfachschule Ch. Weber in Düsseldorf
1965-1966	Freiberufliche Tätigkeit als Gymnastiklehrerin
1966-1975	Beamtet als technische Lehrerin an der Berufsfachschule Ch. Weber in Düsseldorf
1974	Nichtschülerreifeprüfung vor dem Schulkollegium in Düsseldorf
1975	Immatrikulation an der Universität Düsseldorf im Fach "Allgemeinmedizin"
1977	Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf
1978/1980	Erster und zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Düsseldorf
seit 1980	Studentin im Praktischen Jahr am Lukas-Krankenhaus in Neuss (Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf)

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen